



**Departamento  
de Química Orgánica**

**Control de las propiedades supramoleculares de  
ciclodextrinas mediante la incorporación de  
“clips” aromáticos.  
Aplicación al transporte de material génico.**

**Tania Neva Rodríguez  
Sevilla, 2019**





**Departamento  
de Química Orgánica**

**Control de las propiedades supramoleculares de  
ciclodextrinas mediante la incorporación de  
“clips” aromáticos.  
Aplicación al transporte de material génico.**

Memoria presentada por la  
Licenciada Tania Neva Rodríguez  
para optar al grado de Doctor en Química

**Sevilla, 2019**





El presente trabajo ha sido realizado por la Lda. Tania Neva Rodríguez en el Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC - Universidad de Sevilla), bajo la dirección de la Prof. Carmen Ortiz Mellet, Catedrática de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y del Dr. Juan Manuel Benito Hernández, Científico Titular del Instituto de Investigaciones Químicas (CSIC - Universidad de Sevilla).

Los directores del trabajo:

Fdo.: Prof. Carmen Ortiz Mellet

Fdo: Dr. Juan Manuel Benito



## **FINANCIACIÓN**

El trabajo desarrollado en esta Tesis ha estado financiado por la Junta de Andalucía (ref. P12-FQM-1467), por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (CTQ2015-64425-C2-1-R) y por la Fundación Europea para el Desarrollo Regional (FEDER y FSE).

La doctoranda ha sido financiada mediante una beca predoctoral (Personal investigador en formación) asociada al proyecto P12-FQM-1467 de la Junta de Andalucía durante el período 2016-2019.



**Índice General**

Abreviaturas.....	iv
Publicaciones .....	xiv
Resumen .....	xvi
1. Introducción General .....	1
2. Objetivos.....	35
3. Ciclodextrinas con sustituyentes de xilileno tipo clip: control de las propiedades de autoasociación e inclusión y modulación de la conformación .....	47
3.1. Antecedentes bibliográficos .....	47
3.2. Resultados y Discusión.....	50
3.2.1. Síntesis de ciclodextrinas con sustituyentes de xilileno tipo clip.....	50
3.2.2. Elucidación estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear .....	55
3.2.3. Estudio de las propiedades conformacionales .....	58
3.2.4. Estudio de la capacidad de complejación .....	66
3.2.4.1. Estudios de complejación del adamantano carboxilato (AC).....	67
3.2.4.2. Estudios de complejación del 2-metilnaftoato (MN) .....	74

3.2.5. Estudio de las propiedades de autoasociación.....	77
3.3. Conclusiones .....	83
4. Ciclodextrinas con sustituyentes de naftaleno tipo clip: modulación de las propiedades de autoasociación y control de cavidades supramoleculares .....	87
4.1. Antecedentes bibliográficos .....	87
4.2. Resultados y Discusión.....	88
4.2.1. Síntesis de ciclodextrinas con sustituyentes de naftileno tipo clip. ....	88
4.2.2. Estudio de las propiedades de autoasociación .....	92
4.2.3. Estudio de las propiedades conformacionales.....	98
4.2.4. Estudio de la capacidad de complejación del adamantano carboxilato (AC).....	103
4.3. Conclusiones .....	112
5. Ciclodextrinas policatiónicas equipadas con elementos promotores de autoasociación: coensamblaje con ADN y evaluación de su capacidad como vectores de genes.....	115
5.1. El paradigma de la terapia génica.....	115
5.2. Sistemas de transporte de ácidos nucleicos: vectores virales frente a vectores artificiales.....	116
5.3. Sistemas de transporte de genes basados en ciclodextrinas.....	121
5.4. Resultados y Discusión.....	127

5.4.1. Síntesis de ciclodextrinas policatiónicas autoensamblables.....	127
5.4.2. Estudios de interacción con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y dispersión dinámica de la luz (DLS).....	142
5.4.3. Caracterización de los complejos con ADN (CDplejos) mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	153
5.4.4. Eficiencia de transfección en células COS-7 y HepG2.....	157
5.5. Conclusiones .....	159
6. Conclusiones Generales .....	165
7. Experimental Part .....	169
7.1. General Methods.....	169
7.2. Starting Materials.....	178
7.3. New Compounds.....	179

**A**

A	Absorbancia
AC	Adamantan-1-carboxilato sódico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
ARN	Ácido ribonucleico

**B**

BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutica ( <i>Biopharmaceutical classification system</i> )
BHG	Tampón HEPES glucosilado
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
bp	Pares de bases ( <i>base pair</i> )
bPEI	Polietilenimina ramificada ( <i>branched polyethyleneimine</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )



**C**

°C	Grados Celsius
CD	Ciclodextrina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
conc.	Concentrado
Cq	Carbono cuaternario
COS-7	Línea celular derivada de fibroblastos de riñón de mono verde africano
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
ctADN	ADN de timo de ternero ( <i>calf thymus DNA</i> )
CuAAC	Cicloadición dipolar-1,3 de azida y alquino catalizada por Cu(I) ( <i>Cu(I)-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition</i> )
cuant.	Cuantitativo

**D**

$\delta$	Desplazamiento químico
$\Delta G$	Incremento de energía libre de Gibbs
$\Delta H$	Incremento de entalpía
$\Delta S$	Incremento de entropía

DCM	Diclorometano
DIBAL·H	Hidruro de diisobutialuminio
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DLS	Dispersión dinámica de la luz ( <i>dynamic light scattering</i> )
DM	Dinámica molecular
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOSPA	Dioleoilfosfatidiletanolamina ( <i>dioleoylphosphatidylethanolamine</i> )
DOSPA	<i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -[2-(espermincarboxamido)etil]-2,3-bis(dioleiloxi)-1-propilamina pentahidrocloreto ( <i>N,N</i> -dimethyl- <i>N</i> -[2-(spermincarboxamido)ethyl]-2,3-bis(dioleyloxy)-1-propaniminium pentahydrochloride
DOTAP	Cloruro de <i>N</i> -[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio ( <i>N</i> -[1-(2,3- <i>Dioleoyloxy</i> )propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium chloride)

## **E**

$\theta$	Elipticidad molar
$E_{\text{elec}}$	Energía electrostática

$E_{\text{int}}$	Energía de interacción
$E_{\text{vdw}}$	Energía de van der Waals
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	Agencia Europea del Medicamento (European medicine agency)
Eq.	Equivalentes
ESI MS	Espectrometría de masas en modo electrospray ( <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> )
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol

## ***F***

FBS	Suero fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

## ***G***

Glc	Glucosa
GHB	<i>Glucosylated HEPES buffer</i>

**H**

$\eta$	Viscosidad
h	Hora
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico
HepG2	Línea celular derivada de hepatoblastoma humano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherent experiment</i>
HPCD	$\beta$ CD estadísticamente hidroxipropilada
HR-ESI MS	Espectrometría de masas de alta resolución en modo electrospray ( <i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> )
HSQC	<i>Single-Quantum Coherence Spectroscopy</i>
Hz	Hertzio

**I**

I	Intensidad de fluorescencia
i.d.	Diámetro interno ( <i>inner diameter</i> )
ICD	Dicroísmo circular inducido ( <i>induced circular dichroism</i> )

ITC Valoración calorimétrica isoterma (*isothermal Titration Calorimetry*)

## **J**

$J$  Constante de acoplamiento

## **K**

K Kelvin

$K_a$  Constante de asociación

$K_D$  Constante de dimerización

$k_q$  Constante de extinción bimolecular

$K_{sv}$  Constante de Stern-Volmer

## **L**

$\lambda_{em}$  Longitud de onda de emisión

$\lambda_{exc}$  Longitud de onda de excitación

LDA Diisopropilamiduro de litio

Luc Luciferasa

**M**

M3-PALS	<i>Mixed Mode Measurement-Phase Analysis Light scattering</i>
MALDI-TOF MS	Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry</i> )
MBE	<i>Minimal Binding Energy</i>
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
Mel	Yoduro de metilo
MM	Mecánica molecular
MN	2-Naftoato de metilo
MNP	Nanopartícula molecular ( <i>Molecular nanoparticle</i> )
$m/z$	Relación masa/carga

**N**

Naphth	Naftaleno
NOESY	Espectroscopía de RMN de efecto nuclear Overhauser ( <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> )

N/P Relación Nitrógeno/Fósforo

## O

o.d. Diámetro exterior (*Outer diameter*)

## P

paCD Ciclodextrina policationica anfifílica (*polycationic amphiphilic cyclodextrins*)

PAMAM Poliamidoamina

PBS Tampón fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)

PEI Polietilenimina

PEG Polietilenglicol

Ph Fenilo

PI Índice de polidispersidad (*Polydispersity index*)

PLL Poli-L-lisina

ppm Partes por millón

py Piridina

**Q**

q	Atenuador
quant.	<i>Quantitative</i>

**R**

RAMEB	$\beta$ CD metilada estadísticamente ( <i>Randomly-methylated <math>\beta</math>CD</i> )
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROESY	<i>Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rt	Temperatura ambiente ( <i>Room temperature</i> )

**S**

SAR	Estudios de relación estructura-actividad ( <i>Structure-activity relationship studies</i> )
SBCD	$\beta$ CD estadísticamente sulfobutilada
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
<sup>s</sup> TrCl	Cloruro de tris(4- <i>terc</i> -butilfenil)metilo



**T**

$\tau$	Tiempo de vida medio de fluorescencia
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBDMSCI	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsililo
TBE	Tampón Tris-Borato/EDTA
TEM	Microscopía de transmisión electrónica ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TFA	Ácido trifluoroacético
TIBAL	Triisobutilaluminio
TLC	Cromatografía de capa fina
TMV	Virus mosaico del tabaco ( <i>Tobacco mosaic virus</i> )
TOCSY	<i>Totally Correlated Spectroscopy</i>
TPP	Trifenilfosfina
TsCl	Cloruro de tosilo

**U**

UV	Ultravioleta
----	--------------

El trabajo desarrollado en esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas y comunicaciones en congresos:

#### Publicaciones.

- *Xylylene Clips for the Topology-Guided Control of the Inclusion and Self-Assembling Properties of Cyclodextrins.*  
T. Neva, T. Carmona, J. M. Benito, C. Przybylski, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 5588-5597.
- *Dynamic Control of the Self-Assembling Properties of Cyclodextrins by the Interplay of Aromatic and Host-Guest Interactions.*  
T. Neva, T. Carmona, J. M. Benito, C. Przybylski, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Front. Chem.* **2019**, 7, 72.
- *Multiply-linked cyclodextrin-aromatic hybrids: caps, hinges and clips.*  
T. Neva, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *J. Carbohydr. Chem.* **2019**, doi: 10.1080/07328303.2019.1609020.

#### Comunicaciones en congresos.

- **Comunicaciones orales:**
  - *Dynamic control of the self-assembling properties of cyclodextrins by the interplay of aromatic and host-guest interactions.*  
T. Neva. 2º Congreso de Estudiantes de Doctorado en Química. Sevilla (España), octubre **2018**.

- *Self-assembled nanometric systems for the transport of gene material.*

T. Neva. 1<sup>er</sup> Congreso de Estudiantes de Doctorado en Química. Sevilla (España), diciembre **2017**.

- **Pósters:**

- *Xylylene clips for the topology-guided control of the supramolecular properties of cyclodextrins: towards artificial viruses.*

J. M. García Fernandez, T. Neva, J. M. Benito, T. Carmona, C. Przybylski, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti. 29<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium. Lisboa (Portugal), julio **2018**.

- *Molecular engineering of cyclodextrin-based artificial viruses: selective chemical manipulation at control of gene delivery capabilities.*

T. Neva, J. M. Benito, T. Carmona, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernandez. 29<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium. Lisboa (Portugal), julio **2018**. Premio "2018 Cyclodextrin JCC Poster Prize".

- *Tailoring cyclodextrins in route to pH-responsive gene delivery systems.*

T. Neva, L. Gallego-Yerga, J. M. Benito, T. Carmona, F. Mendicuti, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernandez. 19<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium. Barcelona (España), julio **2017**.

Las ciclodextrinas son ciclooligosacáridos naturales formados por unidades de D-glucopiranosas unidas mediante enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Sus propiedades supramoleculares, dictadas por su peculiar arquitectura molecular (un troncocono rígido y hueco), no tienen paralelismo en la naturaleza y constituyen la base de su interés científico y tecnológico, y el fundamento de sus numerosas aplicaciones.

En esta Tesis se ha diseñado una metodología sintética para incorporar diferentes elementos de control conformacional que permitan modular dos de sus propiedades supramoleculares más interesantes: su capacidad de inclusión molecular y la de auto-organización jerarquizada. La estrategia sintética diseñada aprovecha metodologías de desprotección regioselectiva de hidroxilos descritas con anterioridad para la instalación de segmentos aromáticos doblemente unidos, a modo de puente, a posiciones concretas de la cara secundaria de la CD. La geometría y tamaño del segmento aromático en relación a la distancia entre los puntos de anclaje impone restricciones conformacionales que modulan (i) la capacidad de la CD de acomodar a huéspedes en su cavidad y (ii) la de auto-asociarse en forma de dímeros supramoleculares.

Estos elementos de control y modulación de las propiedades supramoleculares se han implementado en el diseño de una nueva familia de vectores artificiales de genes basados en derivados de CD molecularmente bien definidos con capacidad de auto-ensamblaje jerarquizado alrededor de ácidos nucleicos. Así, se ha elaborado una colección de derivados de ciclodextrina en los que se combinan diferentes plataformas oligosacáridicas, clústeres policationicos y elementos promotores de la auto-organización. El estudio exhaustivo de la relación entre estructura molecular y capacidad de condensación de ácidos nucleicos pone de manifiesto que el proceso de co-ensamblaje está dominado por la capacidad de dimerización. De hecho, cambios sutiles en la estructura de las CDs que afectan a esta propiedad conducen a

diferencias morfológica muy relevantes en los agregados con ADN de los que, en última instancia, depende su capacidad de transfección celular.



# Capítulo 1

Introducción General.





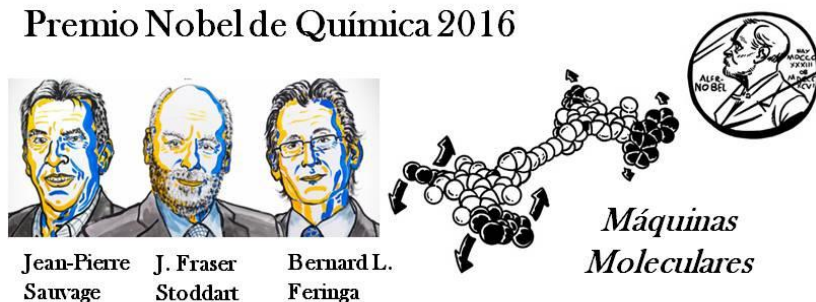
## 1. Introducción General.

### *Química supramolecular.*

La concesión del Premio Nobel de Química en 1987 a Jean-Marie Lehn, Donald J. Cram y Charles J. Pedersen por su contribución al desarrollo de moléculas con capacidad de interaccionar de forma selectiva en función de su estructura<sup>1</sup> constituyó el reconocimiento de la relevancia de la química más allá del enlace covalente, más allá de la molécula. Sus contribuciones originales sobre éteres corona y criptandos contribuyeron a establecer las bases de la química supramolecular, una disciplina orientada al estudio de las estructuras resultantes de las interacciones no covalentes entre moléculas discretas.<sup>2</sup> Si bien es cierto que los principios de la química supramolecular fueron ya intuitos por Emil Fischer a finales del siglo XIX en su hipótesis para explicar la selectividad del funcionamiento de las enzimas sobre sus sustratos,<sup>3</sup> no ha sido hasta finales del XX que los conceptos se han desarrollado en herramientas.

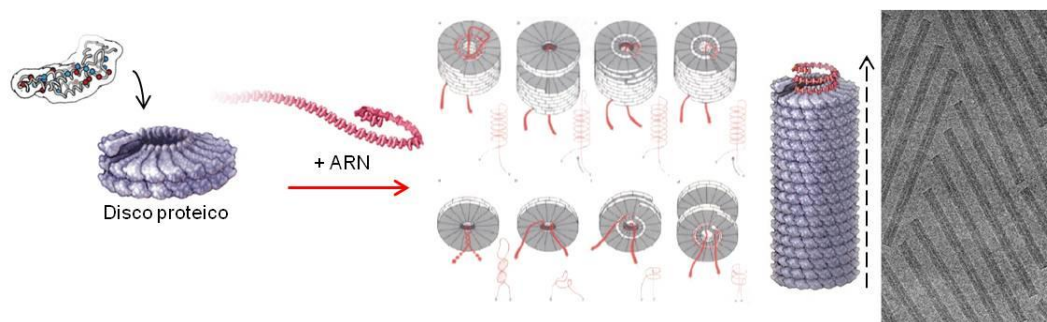
Por un lado, se han establecido las bases para la construcción de estructuras moleculares capaces de relacionarse de manera pre-concebida con su entorno, de auto-organizarse jerárquicamente a escala macroscópica o de desarrollar funciones específicas más allá del nivel molecular. A su vez, éstas han inspirado avances tecnológicos importantes, como el diseño de máquinas moleculares,<sup>4,5</sup> reconocidos de nuevo por la Academia Sueca de las Ciencias en los investigadores J. Fraser Stoddart, Jean-Pierre Sauvage y Bernard L. Feringa, con la concesión del Nobel de Química en 2016 (Figura 1.1.).<sup>6</sup>

## Premio Nobel de Química 2016



**Figura 1.1.** Imagen conmemorativa de la concesión del Premio Nobel de Química 2016 a Jean-Pierre Sauvage, J. Fraser Stoddart y Bernard L. Feringa por el diseño y síntesis de máquinas moleculares.

Por otro, la química supramolecular ha sido capaz de explicar fenómenos naturales con extraordinaria precisión, como el papel fundamental del plegamiento de polipéptidos en la funcionalidad de proteínas, la dinámica del ensamblaje de lípidos en las membranas biológicas o la influencia de la diversidad conformacional del ADN en su funcionalidad. Estas herramientas han facilitado la incursión de la química molecular en la comprensión y manipulación de sistemas biológicos complejos.<sup>7</sup> Los mecanismos de replicación vírica son un ejemplo ilustrativo por la precisión atómica con que la química supramolecular ha llegado a describir a alguno de ellos, como el caso del virus del mosaico del tabaco (TMV, del inglés *tobacco mosaic virus*).<sup>8</sup> Su proteína de cápside tiene una estructura compuesta por 4 hélices  $\alpha$  unidas por bucles; las interacciones hidrofóbicas entre las hélices dirigen el ensamblaje jerarquizado en estructuras en forma de disco alrededor del material génico (ARN), que actúa como un molde (Figura 1.2.). La interacción entre subunidades es un equilibrio dinámico de contactos electrostáticos, polares e hidrófobos que facilita la disociación y la liberación del material génico.



**Figura 1.2.** Representación esquemática del proceso de autoensamblaje del virus del mosaico del tabaco.

Los materiales de los que se componen los seres vivos, un escalón de complejidad por encima de los virus, no dejan de ser sistemas químicos complejos altamente estructurados y ordenados jerárquicamente, basados en la continua interacción dinámica entre moléculas discretas. De hecho, el funcionamiento de esos sistemas naturales no solo ha alimentado el avance de esta disciplina, sino que ha resultado una fuente de inspiración para el desarrollo de nuevos conceptos, estrategias y diseños que imitan funciones biológicas o que implementan patrones de interacción en el desarrollo de otros procesos de interés.<sup>9</sup> La principal lección aprendida a lo largo de estas décadas es la relevancia que tiene el balance entre los distintos tipos de interacciones y su correlación con la disposición espacial (preorganización) de los elementos estructurales que las promueven.<sup>10</sup> El potencial de la química molecular, como anticiparon J.-M. Lehn<sup>11</sup> y D. J. Cram<sup>12</sup> hace 30 años, es enorme en la medida de su capacidad para manipular la estructura de (macro)moléculas con precisión atómica. Y, como han demostrado Stoddart, Feringa, Sauvage o Leigh, entre otros, ofrece a día de hoy una vía tecnológica de respuesta a la cuestión que planteaba Richard Feynman sobre *cómo podrían ser las propiedades de los materiales si pudiéramos organizar sus átomos de la manera que deseásemos* (*What would the properties of materials be if we could really arrange the atoms*

*the way we want them?*) hace casi 60 años en su conferencia “*There’s plenty of room at the bottom*”.<sup>13</sup>

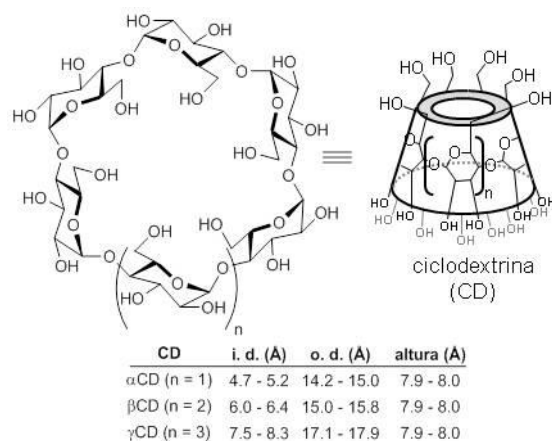
El desarrollo metodológico en síntesis orgánica ha dado lugar a una variedad de estrategias sintéticas versátiles y complementarias, y de utilidad contrastada para la elaboración de estructuras macromoleculares con la misma precisión y fiabilidad que con moléculas pequeñas.<sup>14</sup> Estas metodologías de síntesis macromolecular de precisión (*precision macromolecular chemistry*)<sup>15</sup> ofrecen la oportunidad de imitar a la Naturaleza con sistemas artificiales,<sup>16</sup> de inferir los principios básicos que rigen la relación entre estructura molecular y propiedades supramoleculares<sup>17</sup> o de idear sistemas funcionales capaces de interactuar de forma predeterminada con sistemas biológicos.<sup>18</sup> La mayor parte de los elementos y conceptos necesarios para la elaboración de estos sistemas supramoleculares complejos están disponibles a día de hoy: estrategias de polimerización radicalaria controlada,<sup>19</sup> reacciones de bio- y multi-conjugación tipo click,<sup>20</sup> procesos químicos reversibles sensibles a estímulos o elementos de interacción específica de tipo receptor-ligando entre otros.

Dentro de este escenario, la disponibilidad de plataformas macromoleculares discretas ha resultado ser una herramienta muy conveniente para explorar la construcción de sistemas con propiedades supramoleculares con propiedades diseñadas *ad hoc*.<sup>21</sup> La aplicación de estrategias de síntesis macromolecular de precisión, basadas en transformaciones regioespecíficas/regioselectivas, permiten la instalación de elementos funcionales con una disposición, orientación y/o distribución espacial precisa y predefinida. Estas estrategias dan lugar a arquitecturas moleculares monodispersas que pueden cubrir un amplio espacio de tamaños, formas, propiedades y, consiguientemente, aplicaciones. Así, estructuras polifuncionales macrocíclicas de origen natural o tecnológico, conformacional y configuracionalmente estables, como fulerenos,<sup>22</sup> cucurbiturilos,<sup>23</sup>

ciclopéptidos,<sup>24</sup> ciclotrehalanas,<sup>25</sup> pilarenos,<sup>26</sup> calixarenos<sup>27</sup> y, muy especialmente, ciclodextrinas,<sup>28</sup> han ganado una posición de relevancia en los laboratorios de química supramolecular y constituyen la base estructural de las nanopartículas moleculares (MNPs, del inglés *molecular nanoparticles*).<sup>29</sup>

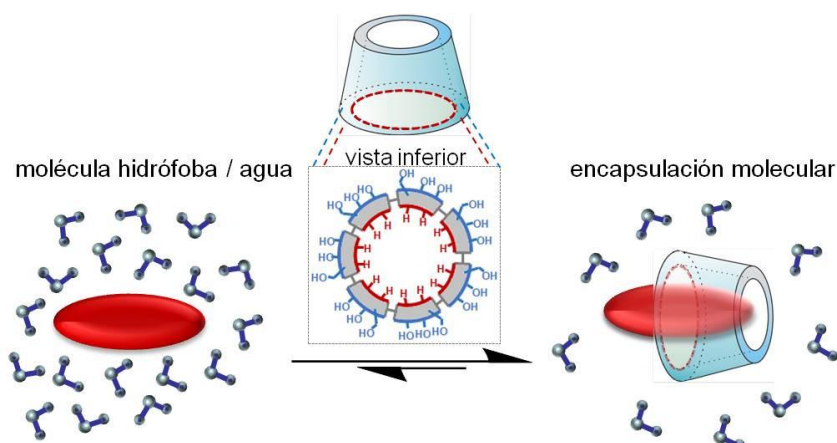
*Química supramolecular y Ciclodextrinas: perspectiva histórica.*

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos de origen natural procedentes de la degradación enzimática del almidón. Fueron identificadas por primera vez por Villiers<sup>30</sup> como productos de degradación bacteriana a finales del siglo XIX y aisladas durante los primeros años del siglo XX por Schardinger.<sup>31</sup> Su estructura cíclica no fue inequívocamente confirmada hasta los años 30', cuando Freudenberg describe su composición estructural: unidades de glucopiranosas enlazadas a través de enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  que dan lugar a una estructura macrocíclica en la que los hidroxilos quedan orientados hacia el exterior, flanqueando los bordes superior (OH-6) e inferior (OHs-2 y 3) (Figura 1.3.).<sup>32</sup> Las ciclodextrinas, independientemente del número de glucosas que las compongan (6, 7 u 8 unidades de glucosa en las ciclodextrinas más habituales,  $\alpha$ -,  $\beta$ -  $\gamma$ CD, respectivamente), resultan así en moléculas de simetría  $C_n$  (con  $n$  correspondiente al número de unidades de glucosa) de dimensiones nanométricas. La altura, definida por la de la unidad de repetición (0.8 nm), es común para todas las CD, mientras que el diámetro externo (*outer diameter*, o.d.) e interno de la cavidad (*inner diameter*, i.d.) se incrementan con el número de glucosas.



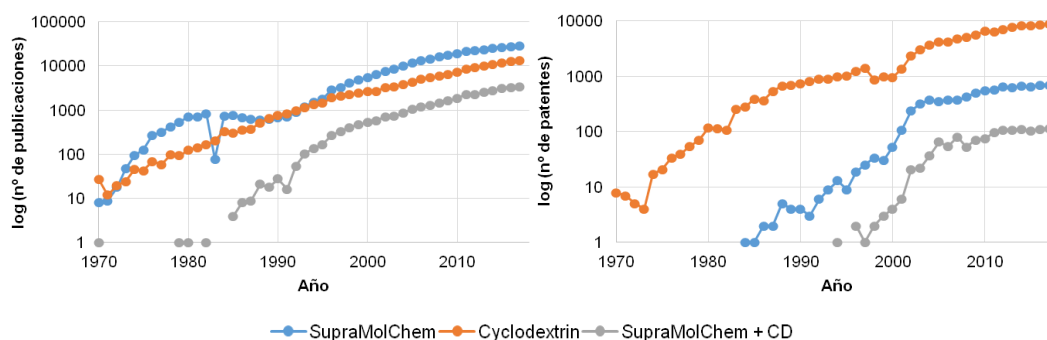
**Figura 1.3.** Estructura general y dimensiones de las CDs nativas.

Las CDs han permanecido como curiosidades químicas y microbiológicas durante más de 50 años,<sup>33</sup> hasta que a mediados de los 50' Cramer pone de manifiesto que su principal valor podría estar directamente relacionado con tres aspectos de su arquitectura molecular: (i) la rigidez de su estructura cíclica, independientemente del número de unidades de glucosa que componen el macrociclo, (ii) su forma de cesta, más parecida a un troncocono que a un cilindro, y (iii) la peculiar distribución de sus hidroxilos, que le confiere un carácter anfílico único (dentro-fuera) con un exterior polar y un interior apolar cubierto con los protones metínicos H-3 y H-5 (Figura 1.4.).<sup>34</sup> Cramer demostró que las CDs podían formar complejos de inclusión reversibles alojando a otras moléculas de tamaño compatible y que este fenómeno era especialmente relevante en el caso de moléculas apolares en entornos polares.<sup>35</sup> A esta contribución pionera le siguieron una serie de trabajos que demostraban el potencial de esta capacidad única tanto en catálisis<sup>36</sup> como en resolución racémica.<sup>37</sup> A pesar de que no fue plenamente reconocido hasta décadas más tarde, actualmente estos trabajos constituyen un hito que cambió el curso de la investigación sobre las ciclodextrinas.



**Figura 1.4.** Estructura de las CDs y su relación con los equilibrios de inclusión molecular.

Las ciclodextrinas constituyen en sí mismo un paradigma ilustrativo del valor de la investigación fundamental. Aunque el desarrollo de su investigación no estuvo motivado con fin práctico inmediato, el conocimiento generado a lo largo de décadas ha encontrado aplicaciones, en forma de desarrollos comerciales, tecnológicos y conceptuales. No deja de haber un cierto paralelismo histórico entre su desarrollo y el nacimiento de la química supramolecular como disciplina desde finales del siglo XIX, con la identificación de las CDs por parte de Villiers y el establecimiento de la hipótesis del mecanismo de llave-cerradura del funcionamiento enzimático propuesto por Fischer. Tras un largo periodo de tiempo, la investigación guiada por la curiosidad dio paso a hitos históricos que desencadenaron la eclosión de aplicaciones hacia finales de los años 70' (Figura 1.5.), cuando ambas disciplinas, química supramolecular y ciclodextrinas, confluyen.



**Figura 1.5.** Comparativa de la evolución científica y tecnológica en los ámbitos de la química supramolecular y ciclodextrinas a través del número de publicaciones científicas (izquierda) y patentes (derecha).<sup>38</sup>

### *Relevancia industrial y tecnológica de las Ciclodextrinas.*

El interés industrial y académico por las ciclodextrinas ha estado dominado por su capacidad de formar complejos de inclusión con huéspedes compatibles con su cavidad hidrofóbica.<sup>39</sup> Este hecho, unido a la solubilidad en agua y compatibilidad con sistemas biológicos, no pasó desapercibido para la industria farmacéutica, en cuyos laboratorios ocupan un lugar de relevancia para manipular la biodisponibilidad de multitud de fármacos desde hace 40 años.<sup>40</sup> La capacidad de las CDs para aumentar la solubilidad aparente de una molécula apolar en agua resultaba ideal para transformar un fármaco *tipo II* de acuerdo con *Biopharmaceutical Classification System* (BCS de la FDA, baja solubilidad en agua y alta permeabilidad a membranas) en uno de *tipo I* (ideal, alta solubilidad y alta permeabilidad). Desde que Japón aprobase en 1976 la comercialización de la primera formulación de este tipo (Prostarmon<sup>TM</sup>, tabletas sublinguales de complejos de prostaglandina E2 y  $\beta$ CD) se han aprobado más de 50 productos farmacéuticos que los incluyen en su formulación.<sup>41</sup>



El aumento de demanda de ciclodextrinas de alta pureza ha estimulado el desarrollo biotecnológico de su producción a volúmenes y precios comparables al de carbohidratos simples como la glucosa (2 €/Kg).<sup>42,43</sup> En la medida de su disponibilidad a escala industrial, el ámbito de aplicación de las ciclodextrinas se ha ampliado a la industria<sup>44</sup> cosmética,<sup>45</sup> textil,<sup>46</sup> alimentaria,<sup>47</sup> medioambiental<sup>48</sup> y analítica<sup>49</sup> (Figura 1.6.).



**Figura 1.6.** Ejemplos de aplicaciones de las CDs en la industria.

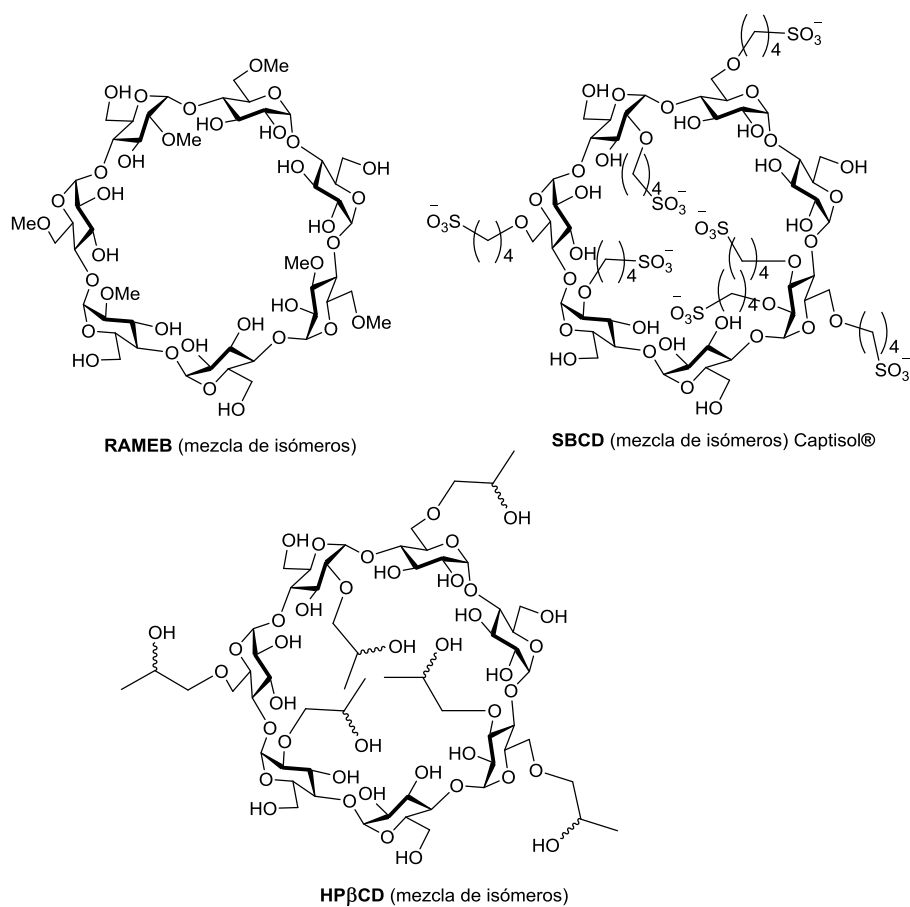
En la actualidad, el mercado global de ciclodextrinas se estima en torno a los 1.000 M€, con una producción superior a las 10.000 toneladas anuales, lo cual no deja de ser sorprendente ya que la diversidad estructural y funcional de ciclodextrinas a nivel comercial es muy limitada. Únicamente tres ciclodextrinas naturales ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ CD) están disponibles comercialmente a escala industrial. Y aunque el precio ya no es una barrera que limite su aplicación, sí lo puede ser la rigidez de estas estructuras, que no siempre se ajusta a las necesidades de un diseño o fin.

*Manipulación química selectiva de Ciclodextrinas.*

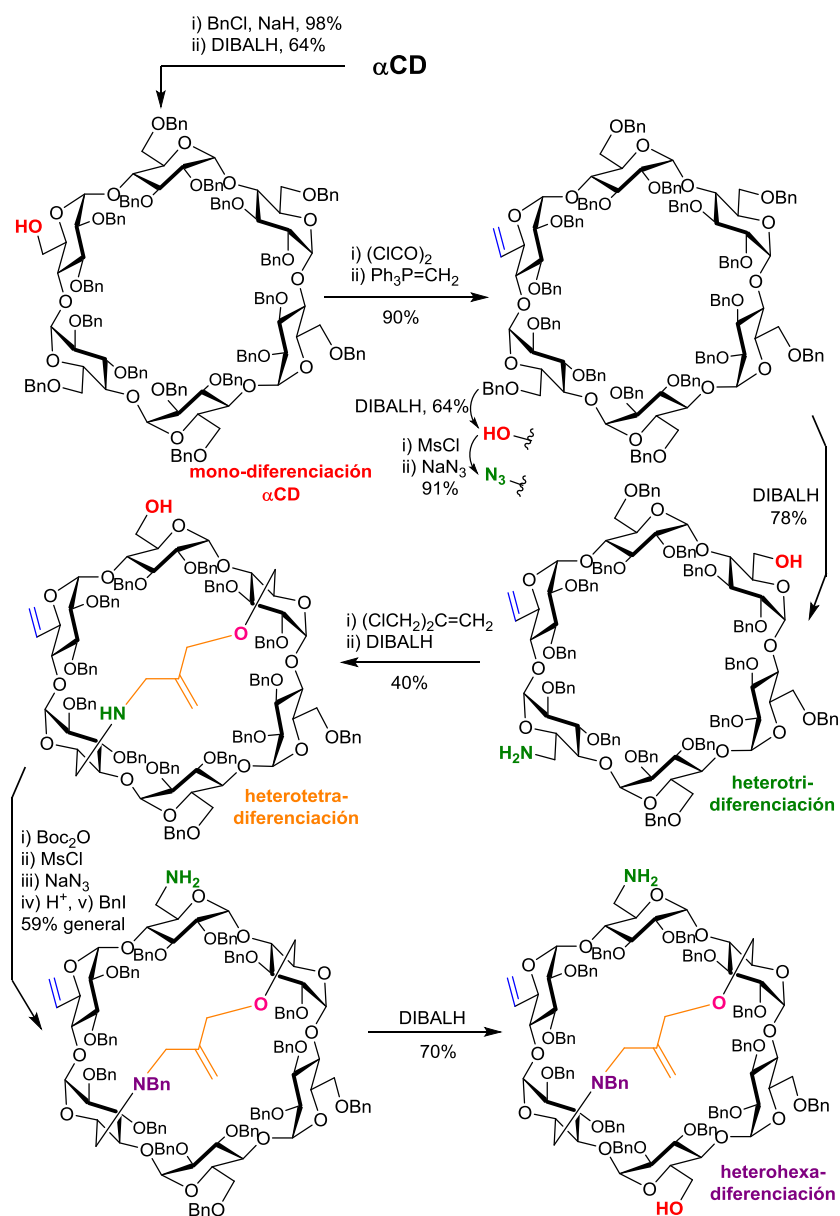
Los esfuerzos para manipular *ad hoc* las propiedades supramoleculares de las ciclodextrinas mediante la modificación química selectiva se han topado con la dificultad de diferenciar entre el gran número de grupos hidroxilo (18, 21 y 24 en  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ CD, respectivamente) y su distribución espacial en el entorno confinado y rígido impuesto por la estructura ciclooligosacarídica. La funcionalización de todos los hidroxilos de la ciclodextrina o sólo de uno de ellos ha sido viable pero asociada a limitaciones severas (bajos rendimientos, pobres (regio)selectividades, purificaciones tediosas...).<sup>50</sup> De hecho, la mayor parte de derivados de CD comerciales a día de hoy son productos estadísticamente metilados (RAMEB, *randomly-methylated  $\beta$ CD*), hidroxipropilados (HPCD) o sulfobutilados (Captisol®) (Figura 1.7.). A pesar de su utilidad como excipientes farmacéuticos, su polidispersidad constituye una limitación para la realización de estudios de relación estructura-funcionalidad.

La metodología clásica de síntesis de carbohidratos, basada en estrategias de grupos protectores, ha resultado poco eficaz para la modificación de CDs en términos generales. Sin embargo, durante las últimas dos décadas se han desarrollado estrategias sintéticas para preparar derivados de CD selectivamente funcionalizados aprovechando la capacidad de inclusión molecular, el control conformacional y la congestión estérica para dirigir selectivamente la reactividad.<sup>51</sup> Un ejemplo ilustrativo es la funcionalización diferenciada de los 6 hidroxilos primarios de la  $\alpha$ CD descrita por M. Sollogoub.<sup>52</sup> A través de una metodología de desbencilación regioselectiva promovida por hidruros de alquilaluminio descubierta por P. Sinaÿ<sup>53</sup> y optimizando la compatibilidad estereoelectrónica entre el agente reductor y el derivado de ciclodextrina, estos autores han diseñado una estrategia de desprotección-

funcionalización secuencial que da acceso a la primera  $\alpha$ CD con 6 grupos funcionales diferenciados en posiciones concretas (Esquema 1.1.).

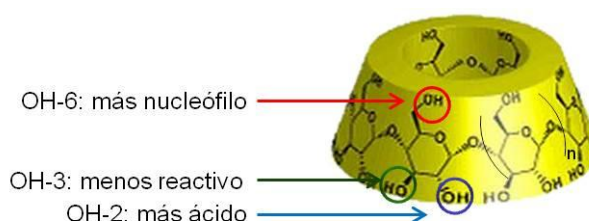


**Figura 1.7.** Ejemplos ilustrativos de derivados comerciales de ciclodextrina estadísticamente funcionalizados.



**Esquema 1.1.** Síntesis de  $\alpha$ CDs ortogonalmente tri-, tetra- y hexadiferenciadas empleando DIBAL·H como agente director de la selectividad.

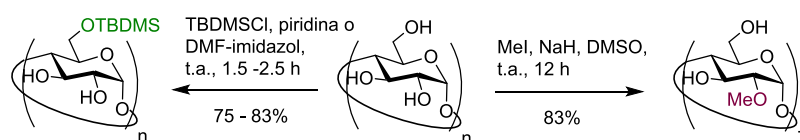
A pesar de su complejidad metodológica, esta contribución pone de manifiesto el nivel de precisión con que se puede intervenir sintéticamente sobre las ciclodextrinas. Como se mencionó anteriormente, las ciclodextrinas poseen tres tipos distintos de hidroxilos (i.e., OH-2, OH-3 y OH-6), cuya disposición les confiere diferencias en su reactividad. Los hidroxilos primarios (OH-6) se orientan hacia el anillo más estrecho del troncocono (denominado anillo primario), están estéricamente más accesibles y son más básicos y nucleofílicos que el resto. Pueden reaccionar preferentemente con electrófilos, incluso con algunos estéricamente impedidos, en presencia de bases débiles. Los hidroxilos secundarios (OH-2 y OH-3) se sitúan en el anillo mayor (o secundario), formando una red de enlaces de hidrógeno intramolecular que aumenta la acidez del OH-2 ( $pK_a$  12.2) significativamente por encima de la de los OH-3 y OH-6<sup>54</sup> (Figura 1.8.). Así, los hidroxilos OH-2 pueden ser desprotonados selectivamente en presencia de bases suficientemente fuertes, mientras que los hidroxilos OH-3 son los menos reactivos y su funcionalización depende de la derivatización previa de las demás posiciones.



**Figura 1.8.** Reactividad diferenciada de los grupos hidroxilo de las CDs.

Este escenario ha inspirado el desarrollo de métodos eficaces de diferenciación selectiva de cada tipo de hidroxilo, como por ejemplo, la perhalogenación<sup>55</sup> y la per-O-alquilación con grupos sililo voluminosos<sup>56</sup> de las

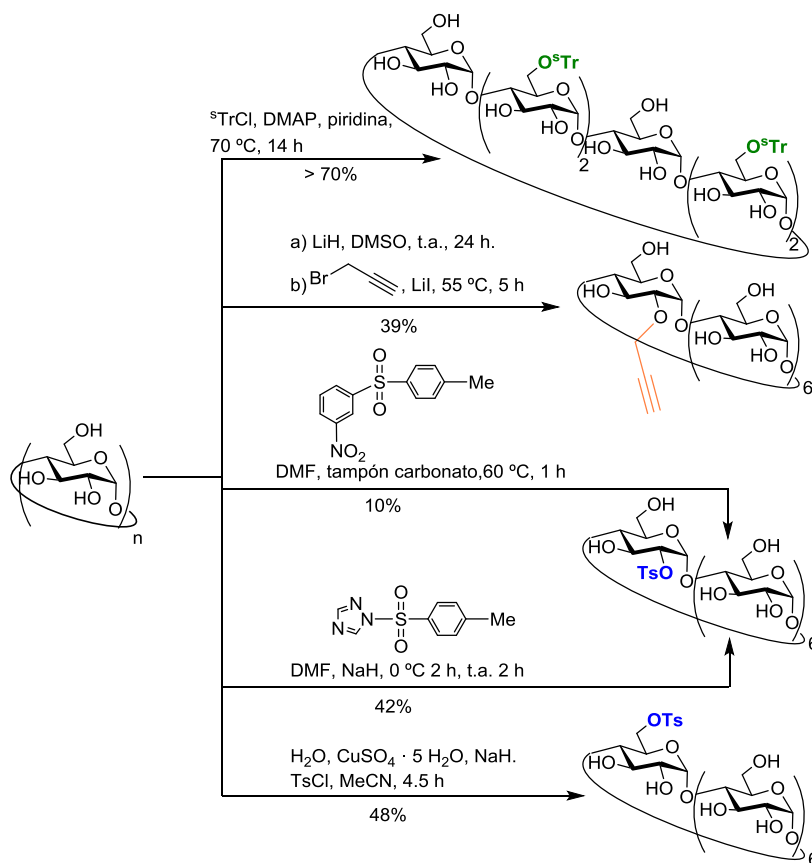
posiciones primarias, o la per-O-metilación de OH-2 en presencia de NaH y MeI,<sup>57</sup> de gran utilidad para la elaboración de derivados de CD facialmente diferenciados (Esquema 1.2.). Sin embargo, estos esquemas tienden a presentar complicaciones a medida que los patrones de funcionalización son más complejos.



**Esquema 1.2.** Estrategias de funcionalización facial selectiva de CDs.

Por otro lado, estas estrategias tampoco resultan eficaces para la funcionalización en una posición específica. La reducción de la proporción de reactivo conlleva rendimientos bajos y purificaciones complejas. Sin embargo, existen ejemplos de gran utilidad práctica, como la mono-O2-propargilación de  $\beta$ CD descrita por Vargas-Berenguel (Esquema 1.3.).<sup>58</sup> Las estrategias para aliviar estos inconvenientes combinan (i) el uso de reactivos voluminosos, que dificulten reacciones posteriores o que puedan dirigir reacciones sucesivas, o (ii) las propiedades de inclusión de las CDs para conducir la reacción a posiciones concretas. Ejemplos ilustrativos del primer caso son los reactivos de tritilación desarrollados por Matt y Armspach para la protección regioselectiva de hidroxilos primarios (Esquema 1.3.),<sup>59</sup> en los que se pone de manifiesto la necesidad de combinar la complementariedad estructural y conformacional entre sustrato y reactivo para obtener una eficiencia sintética. Ejemplo del segundo caso es la reacción de mono-tosilación, que puede ser dirigida regioselectivamente a OH-6 u OH-2 en función de las propiedades de inclusión del reactivo que se emplee y del medio de reacción: derivados de ácido *p*-toluensulfónico activados en forma de ésteres aromáticos (de 3-nitrofenol<sup>60</sup> o 1,2,4-triazolilo)<sup>61</sup> promueven la mono-

O-2-tosilación, mientras que cuando se emplea el cloruro de ácido en presencia de sales de Cu(II), la reacción se dirige selectivamente sobre OH-6<sup>62</sup> (Esquema 1.3.).



**Esquema 1.3.** Estrategias de funcionalización selectiva de CDs en posiciones individuales.

*Sistemas funcionales basados en ciclodextrinas selectivamente modificadas.*

Gracias al desarrollo de metodologías sintéticas específicas en el ámbito de las CDs, en la actualidad es posible usarlas como elementos moleculares para organizar el espacio, tanto hacia el interior, modificando su estructura para modular su capacidad de inclusión molecular, como hacia el exterior, incorporando elementos funcionales que promuevan interacciones específicas con otros sistemas moleculares.

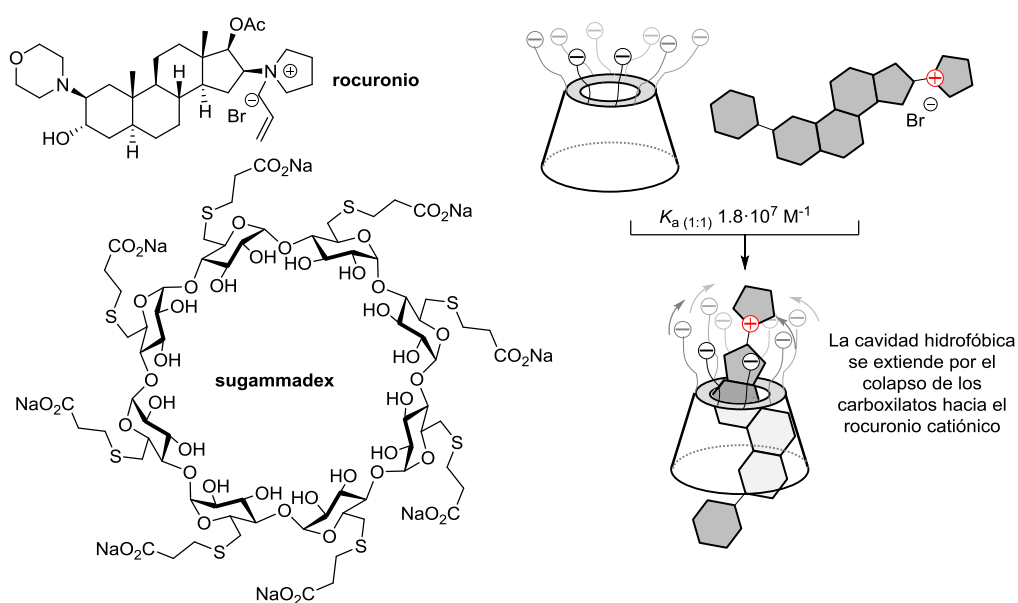
La interconexión de disciplinas en torno a la investigación en ciclodextrinas, desde la síntesis orgánica a la tecnología farmacéutica, o desde la ciencia de materiales y biofísica a la diagnosis, ha facilitado el desarrollo de soluciones tecnológicas para el diseño de sondas moleculares específicas<sup>63</sup> o sistemas de transporte inteligente de fármacos<sup>64</sup> y ácidos nucleicos,<sup>65</sup> sistemas sensibles a estímulos<sup>66</sup> o plataformas de presentación multivalente de elementos de reconocimiento<sup>67</sup> como se ilustra en los ejemplos que se describen a continuación.

*1. Sugammadex: un reversor del efecto anestésico de bloqueadores neuromusculares.*

Uno de los casos que mejor ilustran la modulación de la capacidad de inclusión molecular de CDs es el desarrollo de Sugammadex, un derivado aniónico de  $\gamma$ CD (octakis[6-(3-carboxietil)tio] $\gamma$ CD, Figura 1.9.) comercializado por Merck bajo el nombre de Bridion®. Se emplea para revertir el efecto de bloqueadores neuromusculares esteroideos (i. e. rocuronio) utilizados en anestesia quirúrgica. Teniendo en cuenta la estructura esteroidea de estos relajantes musculares, Zhang optimizó la estructura de un derivado de  $\gamma$ CD para



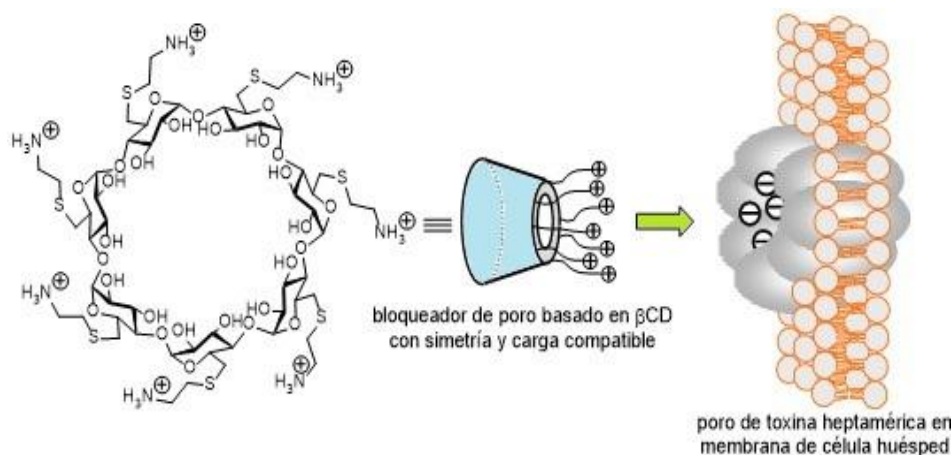
maximizar su capacidad de complejar rocuronio. El resultado fue Sugammadex, que forma un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 con rocuronio con una constante de asociación ( $K_a$ ) de  $1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  (la mayor descrita para un complejo de CD).<sup>68</sup> En el medio biológico, la formación del complejo produce un gradiente de concentración que favorece el desplazamiento irreversible del bloqueador neuromuscular desde su diana biológica al interior de la cavidad de la CD, donde es inactivo, revirtiendo el efecto anestésico en minutos. La capacidad de reversión del efecto anestésico del par rocuronio/sugammadex ha revolucionado la práctica anestésica.<sup>69</sup>



**Figura 1.9.** Estructura de Sugammadex, antagonista del bloqueador neuromuscular rocuronio, y representación esquemática del mecanismo de complejación.

## 2. Inhibidores de toxinas bacterianas y el concepto de la complementariedad de simetría.

La versatilidad con que las CDs se pueden emplear como plataformas para organizar el espacio exterior se puede ilustrar con el diseño de ligandos biológicos de alta afinidad basados en el concepto de la complementariedad de simetría. La naturaleza hace uso frecuentemente de la simetría en la organización jerárquica de estructuras funcionales. Un ejemplo de ello son algunas proteínas excretadas por patógenos, capaces de formar poros en la membrana de las células huésped a través del autoensamblaje formando estructuras de simetría bien definida. Estos poros son empleados para traslocar los factores de toxicidad al interior celular.<sup>70</sup> Este es el caso de la toxina del ántrax, una de las que mayor alarma suscita por su potencial uso como arma biológica, que forma poros de simetría  $C_7$ . Karginov demostró que derivados de  $\beta$ CD, de simetría, tamaño y carga complementaria eran capaces de bloquear la conductividad iónica del poro heptamérico que constituye la proteína PA<sub>63</sub>, uno de los componentes de la toxina de *Bacillus anthracis*, disminuyendo su virulencia (Figura 1.10.).<sup>71</sup> El desarrollo de una metodología sintética eficaz para obtener derivados de  $\beta$ CD homogéneamente funcionalizados ha resultado muy útil para elucidar las bases estructurales de esta inhibición<sup>72</sup> y ampliar la diversidad estructural de candidatos susceptibles de bloquear esta<sup>73</sup> y otras toxinas que forman poros trans-membrana (e.g. *Clostridium botulinum* o *C. perfringens*).<sup>74</sup>



**Figura 1.10.** Inhibidores de la toxina del ántrax basados en el concepto de la complementariedad de simetría.

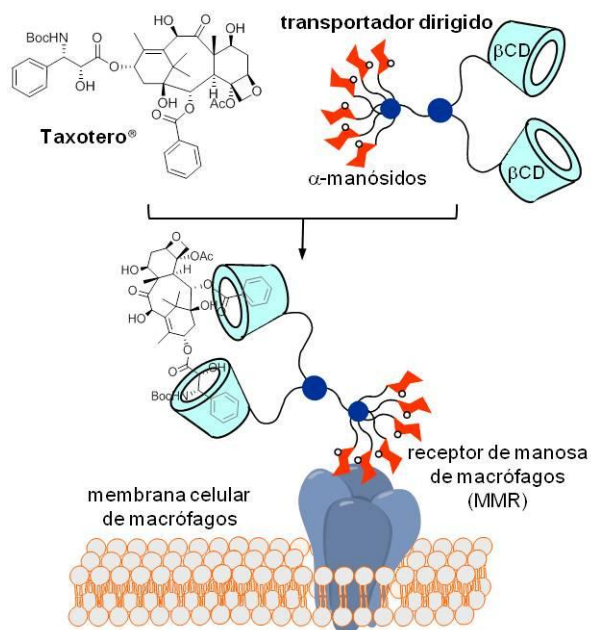
### 3. *Miméticos del glicocálix celular para el estudio de interacciones carbohidrato-proteína.*

La versatilidad de las CDs como plataformas de preorganización también se ha puesto de manifiesto en el estudio de procesos de reconocimiento específico carbohidrato-lectina.<sup>67</sup> Basados en una metodología eficaz de funcionalización homogénea de  $\beta$ CD con antenas sacarídicas, nuestro grupo de investigación preparó una amplia variedad de glicoclusters multivalentes combinando hasta 3 elementos sacarídicos distintos en presentaciones perfectamente definidas.<sup>75</sup> En contraste con lo descrito anteriormente, los experimentos de reconocimiento específico mostraron que, en ambientes de alta densidad sacarídica (similares a los que pueden darse en entornos de reconocimiento de membrana celular), la interacción carbohidrato-lectina puede estar modulada por elementos sacarídicos que, por sí solos, no son activos.<sup>76</sup> Este fenómeno, denominado efecto heterocluster,<sup>77</sup> se suma al conjunto de

factores que determinan el aumento exponencial de afinidad carbohidrato-proteína cuando receptor y ligando se expresan en presentaciones multivalentes.<sup>78</sup> Este fenómeno está recibiendo una creciente atención debido a su relevancia no sólo en procesos de reconocimiento sino también de metabolismo de carbohidratos.<sup>79</sup>

#### 4. *Sistemas de transporte dirigido de fármacos anticancerosos.*

Combinando la dualidad de las CDs como cajas moleculares y sistemas de reconocimiento específico, nuestro grupo de investigación desarrolló un transportador específico del anticanceroso Taxotero® (docetaxel) a macrófagos de ratón. Esta estrategia pretendía limitar los efectos secundarios que la administración inespecífica de este tipo de fármacos suele tener por su interacción *off-target*.<sup>80</sup> Con este objetivo se diseñó una estructura consistente en un dímero de  $\beta$ CD funcionalizado con una antena de vectorización basada en un dendrímero de manosa (Figura 1.11.). El dímero de  $\beta$ CD aumenta la solubilidad del antimitótico 3 órdenes de magnitud en medio acuoso al mismo tiempo que la antena polimanosilada es reconocida por los receptores específicos de manosa/fucosa de la superficie celular de macrófagos.



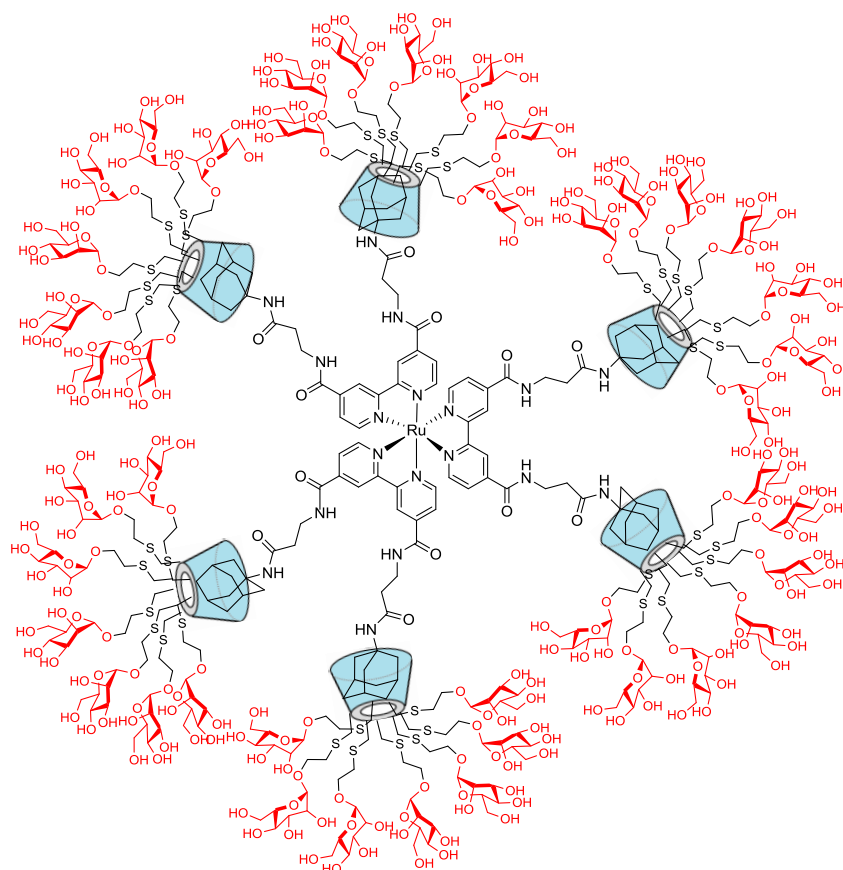
**Figura 1.11.** Sistema de transporte dirigido de Taxotero® a macrófagos basado en βCD.

Siguiendo estrategias similares, en el grupo de investigación se han desarrollado sistemas para el transporte dirigido de doxorubicina a células hepáticas<sup>81</sup> y de chaperonas farmacológicas a macrófagos de Gaucher.<sup>82</sup>

##### 5. Sensores de patógenos basados en ciclodextrinas glicomultivalentes.

Seeberger ha explotado el carácter dual de glicoconjugados basados en CDs para diseñar un sistema para la visualización por fluorescencia de agentes patógenos como *Escherichia coli*.<sup>83</sup> El sistema se basa en un complejo organometálico de Ru(II) fluorescente funcionalizado con 6 unidades de adamantano que se orientan hacia los vértices de un octaedro sobre los que se asocian supramolecularmente 6 derivados manosilados de βCD (Figura 1.12.).

La aidez de la molécula de adamantano por la cavidad de la  $\beta$ CD estabiliza la estructura supramolecular, que es capaz de reconocer mediante fluorescencia la presencia de células que expresan el receptor específico de manosa en su membrana (e.g. *E. coli* ORN178).

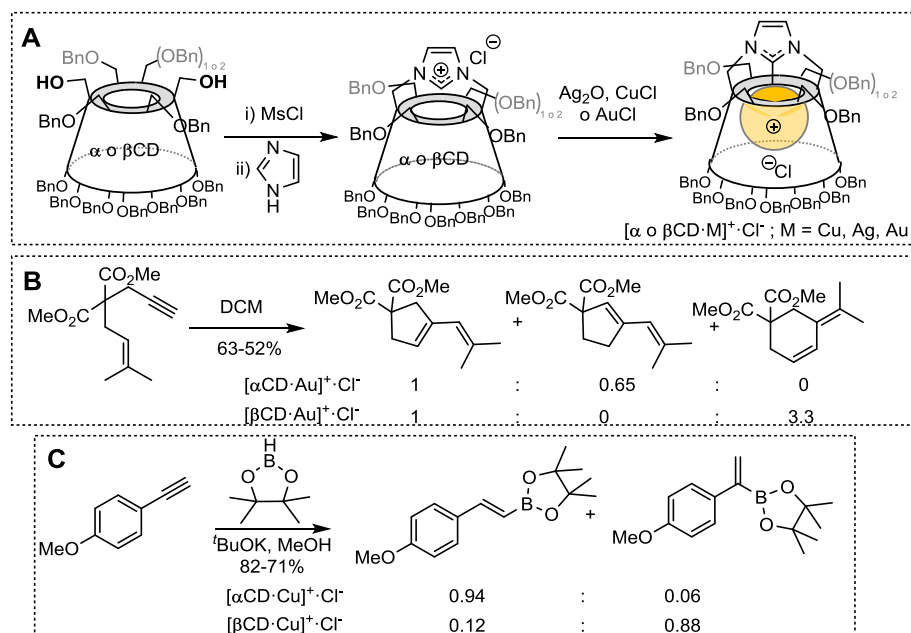


**Figura 1.12.** Ligando hipermultivalente de lectina bacteriana basado en CD.

6. *Ciclodextrinas con tapadera (capped CDs): catálisis organometálica con ligandos CD - carbeno N-heterocíclico (NHC).*

La disponibilidad de métodos de funcionalización química selectiva de CDs permite unir dos posiciones precisas generando puentes que actúan como elementos de restricción conformacional o que incorporan elementos funcionales.<sup>84</sup>

Por ejemplo, empleando una metodología de didesbencilación regioselectiva de posiciones opuestas de la cara primaria de la CD,<sup>85</sup> Sollogoub y colaboradores han preparado derivados de  $\alpha$ - y  $\beta$ CD con dos de sus posiciones primarias unidas mediante un carbeno N-heterocíclico así como sus complejos con metales de transición del grupo 11 (Cu (I), Ag (I) o Au (I)). El metal queda confinado en la cavidad de estos derivados dando lugar a una esfera de coordinación C-H...M única que dirige la actividad catalítica. El tamaño de la cavidad de la CD ( $\alpha$  o  $\beta$ ) resulta ser un factor determinante en la regioselectividad de reacciones como la cicloisomerización catalizada por Au(I) de 1,6-eninos o la hidroboración de alquinos catalizada por Cu(I) (Esquema 1.4.).<sup>86</sup>



**Esquema 1.4.** (A) Síntesis de derivados de  $\alpha$ - y  $\beta$ -CD con cubierta de NHC y de sus complejos con Cu (I), Ag (I) y Au (I). Empleo de los complejos de Au (I) en la cicloisomerización de 1,6-eninos (B) y de los complejos de Cu (I) en la hidroboración de alquinos (C).

## 7. Sistemas autoensamblables basados en ciclodextrinas facialmente diferenciadas.

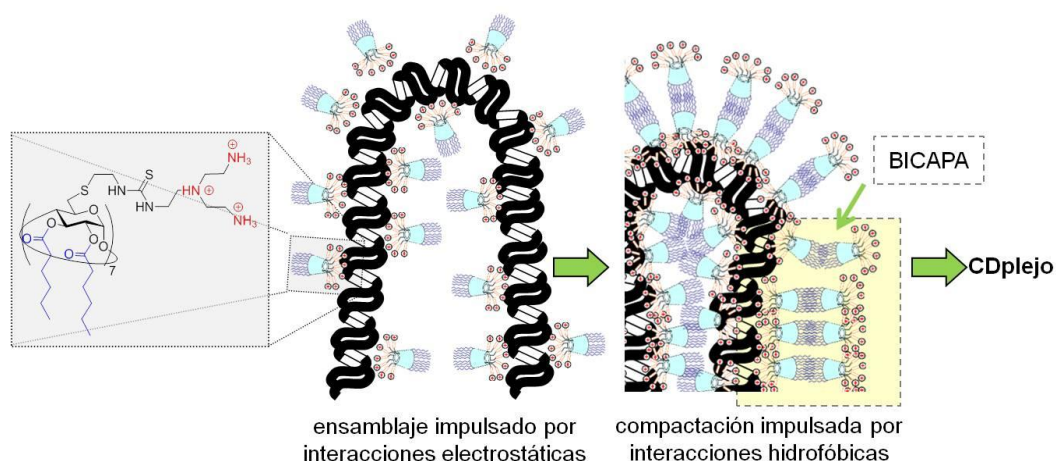
Recientemente, la funcionalización selectiva de ciclodextrinas también ha demostrado su capacidad para promover la formación de sistemas autoensamblados de tamaño nanométrico. Aprovechando la diferente reactividad de hidroxilos primarios y secundarios, se han implementado secuencias sintéticas que permiten preparar macromoléculas facialmente diferenciadas capaces de organizarse jerárquicamente en partículas de morfología, tamaño y propiedades determinadas por el balance anfílico de la estructura molecular del



derivado de CD.<sup>87</sup> Además de la capacidad de encapsulación en el interior de estas nanopartículas, la presencia de la plataforma de CD contribuye a la estabilización de huéspedes hidrofóbicos dando origen a sistemas con capacidad de transporte y liberación controlada de fármacos de baja biodisponibilidad.<sup>88</sup>

La capacidad de dirigir el ensamblaje dando lugar a estructuras de tamaño nanométrico ( $\approx 100$  nm) en base a la naturaleza y disposición de los elementos funcionales incorporados a las CDs ha permitido desarrollar sistemas para la liberación controlada,<sup>89</sup> la reacción frente a estímulos (físicos, químicos o biológicos) o sistemas de diagnóstico, algunos de los cuales se encuentran en avanzados estadios de ensayos clínicos.<sup>90</sup>

En concreto, la preparación de ciclodextrinas policationicas anfifílicas (paCDs, *polycationic amphiphilic cyclodextrin*) con dominios catiónicos y lipofílicos segregados en cada una de sus caras<sup>65</sup> ha dado lugar a estructuras capaces de condensar ácidos nucleicos (i. e. ADNp, ADN plasmídico) en nanopartículas estables y homogéneas denominadas CDplejos.<sup>91</sup> Este proceso de ensamblado está dirigido por la molécula de ácido nucleico, que actúa como un molde. Se presume que ocurre en dos etapas: primero, las interacciones electrostáticas entre el ácido nucleico (polianiónico) y las paCDs (policatiónicas) neutralizan el polinucleótido y, alcanzada una densidad lipófila suficiente, se produce una condensación hidrofóbica que expulsa moléculas de agua de hidratación y compacta la estructura (Figura 1.13.); un mecanismo que recuerda al que opera en el ensamblaje de las partículas virales. Diferentes estrategias sintéticas han puesto de manifiesto el potencial de este concepto para regular las propiedades biofísicas y la capacidad de transfección de las nanopartículas resultantes en base a la estructura molecular del derivado de CD.<sup>28b,92</sup>

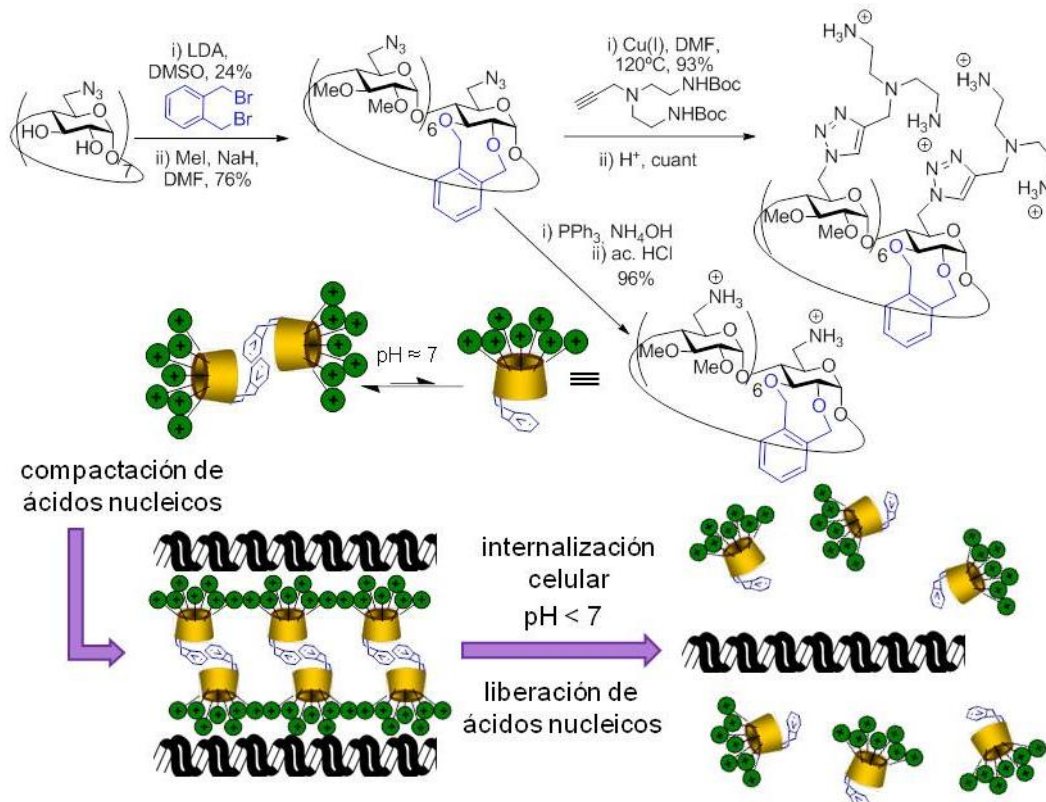


**Figura 1.13.** Mecanismo propuesto de autoensamblaje jerarquizado de CDs policationicos anfifilicos (paCDs) y ácidos nucleicos para formar CDplejos.

Las partículas resultantes son capaces de proteger el material génico de la degradación en el medio biológico y de facilitar su internalización en una amplia variedad de líneas celulares, promoviendo su expresión con una eficacia que eventualmente supera a la de vectores de genes de referencia como la polietilenimina de alto peso molecular (PEI, 25 kDa) o la Lipofectamina®. Aunque su eficacia es inferior a la de los vectores virales, la posibilidad de modular las propiedades supramoleculares a través de la modificación química selectiva de la estructura molecular ofrece oportunidades sin precedentes para el desarrollo *ad hoc* de sistemas de transfección de genes en los que se puede optimizar parámetros fundamentales como la toxicidad, capacidad de carga, mecanismo de ensamblaje y/o desensamblaje, tropismo celular, etc. Tal es el potencial que se infiere de esta aproximación que su aplicación sobre otras plataformas molecularmente bien definidas, como calixarenos,<sup>93</sup> pilarenos,<sup>26</sup> ciclopéptidos<sup>24</sup> o ciclooligosacáridos sintéticos<sup>25</sup> no ha tardado en ser explorada.

Estudios desarrollados sobre una amplia diversidad estructural de CDs facialmente diferenciadas indican que su eficacia de transfección está relacionada con su capacidad de ordenamiento alrededor de la secuencia oligonucleotídica en forma de bicapa lipídica.<sup>28b,94</sup> En el caso de las paCDs, la formación de la bicapa se producía en la segunda etapa de condensación (Figura 1.13.) a través de la alineación enfrentada de los dominios hidrofóbicos de las CDs. Este fenómeno requiere un balance adecuado entre la densidad de carga positiva en una cara y el número y longitud de las cadenas alifáticas en la opuesta.<sup>95</sup> Esta estrategia de control del proceso de autoensamblaje ha sido una de las más investigadas, no sólo en el ámbito de las CDs,<sup>21b</sup> sino también en otros tipos de plataformas macrocíclicas (e.g. calixarenos).<sup>93</sup>

Una alternativa a esta estrategia general para promover la formación de bicapas consiste en el uso de CDs con tendencia a formar dímeros no covalentes. Así, la incorporación de un elemento aromático en la cara secundaria de la  $\beta$ CD catiónica es capaz de promover la formación de dímeros en los que los dominios policationicos se encuentran dispuestos en sentidos opuestos (Esquema 1.5.). Estos dímeros, alineados alrededor de la cadena de ADN, a modo de molde, se ordenan formando bicapas. Así, los CDplejos resultantes eran capaces de proteger el ácido nucleico y promover su internalización celular.<sup>96</sup>



**Esquema 1.5.** Síntesis de los derivados policationicos con anillo de *o*-xilileno uniendo las posiciones 2<sup>l</sup> y 3<sup>l</sup> y mecanismo propuesto para la condensación jerárquica.

El conjunto de antecedentes comentados pone de manifiesto el interés suscitado en torno a la derivatización química selectiva de las ciclodextrinas. La modificación de estructuras nanométricas basadas en ciclodextrinas con precisión atómica y el análisis sistemático de las consecuencias sobre sus propiedades supramoleculares (reconocimiento por receptores específicos, capacidad de organización jerarquizada, sensibilidad a estímulos, comportamiento dinámico...) resultan herramientas muy poderosas para el diseño de sistemas funcionales.

- <sup>1</sup> <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1987/summary/>
- <sup>2</sup> J.-M. Lehn, *Science* **1993**, *260*, 1762-1763.
- <sup>3</sup> E. Fischer, *Ber. Ges. Dtsch. Chem.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- <sup>4</sup> El término máquina molecular se aplica a un sistema de composición molecularmente bien definido (discreto) cuyo diseño responde a la realización de movimientos (mecánicos) precisos en respuesta a un estímulo externo concreto.
- <sup>5</sup> a) B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11060-11078; b) J.-P. Sauvage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11080-11093; c) J.-F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11094-11125; d) S. Erbas-Cakmak, D. A. Leigh, C. T. McTernan, A. L. Nussbaumer, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10081-10206; e) *The Nature of the Mechanical Bond: From Molecules to Machines* (Ed. C. J. Burns, J.-J. Stoddart), Wiley, Hoboken NJ, 2017, vol. 1.
- <sup>6</sup> <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2016/press-release/>
- <sup>7</sup> I. Saraogi, B. A. Bhogem Y. M. Gangarde, *Supramolecular assemblies in chemical biology*, en *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* (Ed. J. L. Atwood), Elsevier, Saint Louis, 2017, vol. 4, pp 3-37.
- <sup>8</sup> *Macromolecular Assembly* (Ed. T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz, G. T. Johnson), en *Cell Biology*, Elsevier, 2017, pp 63-74.
- <sup>9</sup> a) S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991-1003; b) M. C. Branco, J. P. Scheneider, *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 817-831; c) J. H. Collier, *Soft Matter* **2008**, *4*, 2310-2315.
- <sup>10</sup> K. Goto, en *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* (Ed. J. L. Atwood), Elsevier, Amsterdam, 2017, vol. 1, pp 61-71.
- <sup>11</sup> J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304-1319.
- <sup>12</sup> D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1039-1057.
- <sup>13</sup> R. P. Feynman, *Eng. Sci.* **1960**, *23*, 22-36.
- <sup>14</sup> C. J. Hawker, K. L. Wooley, *Science* **2005**, *309*, 1200-1205.
- <sup>15</sup> a) B. S. Sumerlin, A. P. Vogt, *Macromolecules* **2010**, *43*, 1-13; b) W.-B. Zhang, X. Yu, C.-L. Wang, H.-J. Sun, I.-F. Hsieh, Y. Li, X.-H. Dong, K. Yue, R. Van Horn, S. Z. D. Cheng, *Macromolecules* **2014**, *47*, 1221-1239.
- <sup>16</sup> C. S. Mahon, D. A. Fulton, *Nature Chem.* **2014**, *6*, 665-672.
- <sup>17</sup> J.-F. Lutz, J.-M. Lehn, E. W. Meijer, K. Matyjaszewski, *Nature Rev. Mater.* **2016**, *1*, 16024.
- <sup>18</sup> M. J. Webber, R. Langer, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6600-6620.
- <sup>19</sup> a) J.-F. Lutz, M. Ouchi, D. R. Liu, M. Sawamoto, *Science* **2013**, *341*, 123-149; b) F. J. Xu, W. T. Yang, *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 1099-1131.
- <sup>20</sup> J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.

- <sup>21</sup> a) C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6728-6742; b) J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *42*, 18-37.
- <sup>22</sup> E. Nakamura, H. Isobe, N. Tomita, M. Sawamura, S. Jinno, H. Okayama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4254-4257.
- <sup>23</sup> B. Vinciguerra, L. Cao, J. R. Cannon, P. Y. Zavalij, C. Fenselau, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13133-13140.
- <sup>24</sup> E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy, S. Ulrich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10183-10187.
- <sup>25</sup> J. L. Jiménez Blanco, F. Ortega-Caballero, L. Blanco-Fernández, T. Carmona, G. Marcelo, M. Martínez-Negro, E. Aicart, E. Junquera, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 10117-10120.
- <sup>26</sup> I. Nierengarten, M. Nothisen, D. Sigwalt, T. Biellmann, M. Holler, J.-S. Remy, J. F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17552-17558.
- <sup>27</sup> a) Y. Shi, H.-J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, *2*, 1797-1803; b) L. Gallego-Yerga, M. Lomazzi, V. Franceschi, F. Sansone, C. Ortiz Mellet, G. Donofrio, A. Casnati, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1708-1723.
- <sup>28</sup> a) B. J. Ravoo, R. Darcy, *Angew. Chem.* **2000**, *39*, 4324-4326; b) A. Díaz-Moscoso, L. Le Gourriérec, M. Gómez-García, J. M. Benito, P. Balbuena, F. Ortega-Caballero, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. OrtizMellet, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888.
- <sup>29</sup> W.-B. Zhang, X. Yu, C.-L. Wang, H.-J. Sun, I.-F. Hsieh, Y. Li, X.-H. Dong, K. Yue, R. Van Horn, S. Z. D. Cheng, *Macromolecules* **2014**, *47*, 1221-1239.
- <sup>30</sup> a) A. Villiers, *Compt. Rend.* **1891**, *112*, 412-437; b) A. Villiers, *Compt. Rend.* **1891**, *112*, 536-538.
- <sup>31</sup> a) F. Schardinger, *Z. Unters. Nahr. Genussm.* **1903**, *6*, 865-880; b) F. Schardinger, *Wiener Klin. Wochenschr.* **1904**, *17*, 207-209; c) F. Schardinger, *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Abt. II* **1905**, *14*, 772-781; d) F. Schardinger, *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Abt. II* **1911**, *29*, 188-197.
- <sup>32</sup> a) K. Freudenberg, G. Blomqvist, L. Ewald, K. Soff, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1936**, *69*, 1258-1266; b) K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, *Ber. Chem.* **1938**, *71*, 1596-1600; c) K. Freudenberg, E. Schaaf, G. Dumpert, T. Ploetz, *Naturwissenschaften* **1939**, *27*, 850-853.
- <sup>33</sup> Para una revisión exhaustiva sobre ciclodextrinas desde un punto de vista histórico, ver: G. Crini, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940-10975.
- <sup>34</sup> F. Cramer, *Angew. Chem.* **1952**, *64*, 136.
- <sup>35</sup> a) F. Cramer, F. M. Henglein, *Angew. Chem.* **1956**, *68*, 649; b) F. Cramer, F. M. Henglein, *Chem. Ber. Recl.* **1957**, *90*, 2572-2575.
- <sup>36</sup> F. Cramer, W. Kampe, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1115-1120.
- <sup>37</sup> F. Cramer, W. Dietsche, *Chem. Ber. Rec.* **1959**, *92*, 378-384.

- <sup>38</sup> Base de datos Scopus, consultada a fecha de 13 de febrero de 2019.
- <sup>39</sup> a) A. Hashidzume, Y. Takashima, H. Yamaguchi, A. Harada, en *Comprehensive supramolecular chemistry II* (Ed. J. L. Atwood), Elsevier, Amsterdam, 2017, Vol. 1, pp 269-316; b) *Cyclodextrins and their complexes* (Ed. H. Doziuk), Wiley-VCH, Weinheim, 2006; c) P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **2018**, 535, 272-284; d) G. Crini, S. Fourmentin, É. Fenyvesi, G. Torri, M. Fourmentin, N. Morin-Crini, en *Cyclodextrin fundamentals, reactivity and analysis* (Ed. S. Fourmentin, G. Crini, E. Lichtfouse), Springer, 2018, pp. 1-55.
- <sup>40</sup> a) C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, en *Supramolecular systems in biomedical fields* (Ed. H.-J. Schneider) RSC, Cambridge, 2013, pp. 94-139; b) M. E. Brewster, T. Loftsson, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59, 645-666; c) Loftsson, D. Duchêne, *Int. J. Pharm.* **2007**, 329, 1-11; d) M. E. Davies, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 1024-1035.
- <sup>41</sup> a) P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int. J. Pharm.* **2018**, 535, 272-284; b) T. Loftsson, M. D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A., Concheiro, *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, 68, 544-555.
- <sup>42</sup> W. J. Shieh, A. R. Hedges, US5326701 A, **1994**; b) S. Mori, T. Mase, T. Ohya, US5707833 A, **1998**; c) B. Kottwitz, K. H. Maurer, R. Breves, I. Schmidt, A. Weber, A. Hellebrandt, L. Polanyi-Bald, US7888104 B2, **2011**.
- <sup>43</sup> A. Biber, G. Antranikian, E. Heinzle, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59, 609-617.
- <sup>44</sup> <https://cyclodextrinnews.com/> visitada el 19 de febrero de 2019.
- <sup>45</sup> N. Tarimci, en *Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics, and biomedicine: Current and future industrial applications* (Ed. E. Bilensoy), Wiley-VCH, Weinheim, 2011, pp. 131-144.
- <sup>46</sup> a) J. Szejtli, *Starch* **2003**, 55, 191-196; b) C.-D. Radu, O. Parteni, L. Ochiuz, *J. Control. Release* **2016**, 224, 146-157.
- <sup>47</sup> K. Martina, A. Binello, D. Lawson, L. Jicsinszky, G. Cravotto, *Curr. Nutr. Food Sci.* **2013**, 9, 167-179.
- <sup>48</sup> N. Morin-Crini, G. Crini, *Progr. Polym. Sci.* **2013**, 38, 344-368.
- <sup>49</sup> L. Szenté, J. Szeman, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 8024-8030.
- <sup>50</sup> A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1977-1996.
- <sup>51</sup> a) S. Guieu, M. Sollogoub, en *Synthetic Methods in Carbohydrate Chemistry: From Monosaccharides to Complex Glycans* (Ed. D. B. Werz, S. Vidal) Wiley VCH, Weinheim, 2014, pp. 241-283; b) J. M. Benito, J. M. García Fernández, en *Protecting groups: Strategies and applications in carbohydrate chemistry* (Ed. S. Vidal) Wiley VCH, Weinheim, 2019, pp. 373-395.
- <sup>52</sup> B. Wang, E. Zaborova, S. Guieu, M. Petrillo, M. Guitet, Y. Blériot, M. Ménand, Y. Zhang, M. Sollogoub, *Nature Commun.* **2014**, 5, 5354.



- 
- <sup>53</sup> a) A. J. Pearce, P. Sinaÿ, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3610-3612; b) T. Lecourt, A. Herault, A. J. Pearce, M. Sollogoub, P. Sinaÿ, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2960-2971.
- <sup>54</sup> R. I. Gelb, L. M. Schwartz, J. J. Bradshaw, D. A. Laufer, *Bioorg. Chem.* **1980**, 9, 299-304.
- <sup>55</sup> A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 30, 78-80.
- <sup>56</sup> a) K. Takeo, K. Uemura, H. Mitoh, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, 7, 293-308; b) P. Fügedi, *Carbohydr. Res.* **1989**, 192, 366-369; c) K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 203-221.
- <sup>57</sup> D. Rong, V. T. D'Souza, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 4275-4278.
- <sup>58</sup> J. M. Casas-Solva, E. Ortiz-Salmerón, I. Fernández, L. García-Fuentes, F. Santoyo-González, A. Vargas-Berenguel, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 8146-8162.
- <sup>59</sup> a) L. Poorters, D. Armspach, D. Matt, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1377-1381; b) E. Engeldinger, D. Armspach, D. Matt, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4147-4173.
- <sup>60</sup> A. Ueno, R. Breslow, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 3451-3454.
- <sup>61</sup> H. Law, I. Baussanne, J. M. García Fernández, H. Law, J. Defaye, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 451-453.
- <sup>62</sup> a) I. Baussanne, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, H. Law, J. Defaye, *Chem. Commun.* **2000**, 1489-1490; b) H. Law, J. M. Benito, J. M. García Fernández, L. Jicsinszky, S. Crouzy, J. Defaye, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 7524-7532.
- <sup>63</sup> W.-F. Lai, A. L. Rogach, W.-T. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 6379-6419.
- <sup>64</sup> M. J. Brewster, R. Langer, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 6600-6620.
- <sup>65</sup> C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 38, 1586-1608.
- <sup>66</sup> a) D. W. Bartlett, M. E. Davis, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 456-468; b) R. J. Dong, L. Z. Zhou, J. L. Wu, L. C. Tu, Y. Su, B. Zhu, H. Gu, D. Yan, X. Zhu, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5473-5475.
- <sup>67</sup> A. Martínez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4746-4773.
- <sup>68</sup> a) A. Bom, M. Bradley, K. Cameron, J. K. Clark, J. van Egmond, H. Feilden, E. J. MacLean, A. W. Muir, R. Palin, D. C. Rees, M.-Q. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 265-270; b) J. M. Adam, D. J. Bennett, A. Bom, J. K. Clark, H. Feilden, E. J. Hutchinson, R. Palin, A. Prosser, D. C. Rees, G. M. Rosair, D. Stevenson, G. J. Tarver, M.-Q. Zhang, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1806-1816.
- <sup>69</sup> R. Miller, *Anesth. Analg.* **2007**, 104, 477-478.
- <sup>70</sup> E. M. Nestorovich, S. M. Bezrukov, *Chem. Rev.* **2012**, 112, 6388-6430.
- <sup>71</sup> V. A. Karginov, E. M. Nestorovich, M. Moayeri, S. H. Leppla, S. M. Bezrukov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15075-15080.



- <sup>72</sup> A. Díaz-Moscoso, A. Méndez-Ardoy, F. Ortega-Caballero, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, T. M. Robinson, A. Yohannes, V. A. Karginov, J. M. García Fernández, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 181-192.
- <sup>73</sup> A. Joshi, S. Kate, V. Poon, D. Mondal, M. B. Boggara, A. Saraph, J. T. Martin, R. McAlpine, R. Day, A. E. Garcia, J. Mogridge, R. S. Kane, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 791-796.
- <sup>74</sup> E. M. Nesorovich, V. A. Karginov, M. R. Popoff, S. M. Bezrukov, H. Barth, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23927.
- <sup>75</sup> M. Gómez-García, J. M. Benito, D. Rodríguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7970-7971.
- <sup>76</sup> a) M. Gómez-García, J. M. Benito, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. L. Jiménez Blanco, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1849-1860; b) M. Gómez-García, J. M. Benito, A. P. Butera, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. L. Jiménez Blanco, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1273-1288.
- <sup>77</sup> J. L. Jiménez Blanco, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4518-4531.
- <sup>78</sup> *Multivalency: Concepts, research and applications* (Eds. J. Huskens, L. J. Prins, R. Haag, B. J. Ravoo), Wiley, New York, 2018.
- <sup>79</sup> a) C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, J. M. García Fernández, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 6428-6436; b) M. I. García-Moreno, F. Ortega-Caballero, R. Rísquez Cuadro, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 6295-6304; c) B. Thomas, M. Fiore, G. C. Daskhan, N. Spinellia, O. Renaudet, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5436-5439; d) A. Meyer, M. Noël, J.J. Vasseur, F. Morvan, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2921-2927.
- <sup>80</sup> J. M. Benito, M. Gómez García, C. Ortiz Mellet, I. Baussanne, J. Defaye, J. M. García Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10355-10363.
- <sup>81</sup> G. J. L. Bernardes, R. Kikkeri, M. Maglinao, P. Laurino, M. Collot, S. Y. Hong, B. Lepenies, P. H. Seeberger, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4987-4996.
- <sup>82</sup> J. Rodríguez-Lavado, M. de la Mata, J. L. Jiménez-Blanco, M. I. García-Moreno, J. M. Benito, A. Díaz-Quintana, J. A. Sánchez-Alcázar, K. Higaki, E. Nanba, K. Ohno, Y. Suzuki, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2289-2301.
- <sup>83</sup> D. Grünstein, M. Maglinao, R. Kikkeri, M. Collot, K. Barylyuk, B. Lepenies, F. Kamena, R. Zenobi, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13957-13966.
- <sup>84</sup> T. Neva, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *J. Carbohydr. Chem.* **2019**, doi: 10.1080/07328303.2019.1609020.
- <sup>85</sup> a) A. J. Pearce, P. Sinaÿ, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610-3612; b) T. Lecourt, A. Herault, A. J. Pearce, M. Sollogoub, P. Sinaÿ, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2960-2971; c) O. Bistri, P. Sinaÿ, M. Sollogoub, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7757-7760.

- <sup>86</sup> a) M. Guitet, P. Zhang, F. Marcelo, C. Tugny, J. Jiménez-Barbero, O. Buriez, C. Amatore, V. Mouriès-Mansuy, J.-P. Goddard, V. Fensterbank, Y. Zhang, S. Roland, M. Ménand, M. Sollogoub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7213-7218. b) P. Zhang, J. Meijide Suárez, T. Driant, E. Derat, Y. Zhang, M. Ménand, S. Roland, M. Sollogoub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10821-10825; c) P. Zhang, C. Tugny, J. Meijide Suárez, M. Guitet, E. Derat, N. Vanthuyne, Y. Zhang, O. Bistri, V. Mouriès-Mansuy, M. Ménand, S. Roland, L. Fensterbank, M. Sollogoub, *Chem.* **2017**, *3*, 174-191.
- <sup>87</sup> E. Bilensoy, A. A. Hincal, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 1161-1173.
- <sup>88</sup> a) F. Perret, M. Duffour, Y. Chevalier, H. Parrot-Lopez, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *83*, 25-32; b) Y. Çirpanli, E. Allard, C. Passirani, E. Bilensoy, L. Lemaire, S. Çaliş, J.-P. Benoit, *Int. J. Pharm.* **2011**, *403*, 201-206; c) J. Yameogo, A. Géze, L. Choissnard, J.-L. Putaux, R. Semde, D. Wouessidjewe, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 526-541; d) A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, A. Gèze, J.-L. Puteaux, D. Wouessidjewe, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *Med. Chem.* **2012**, *8*, 524-532.
- <sup>89</sup> a) J. Zhang, P. X. Ma, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1215-1233; b) Q.-D. Hu, G.-P. Tang, P. K. Chu, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2017-2025.
- <sup>90</sup> a) X. Tian, M. Nguyen, H. P. Foote, J. M. Caster, K. C. Roche, C. G. Peters, P. Wu, L. Jayaraman, E. G. Garmey, J. E. Tepper, S. Eliasof, A. Z. Wang, *Cancer Res.* **2017**, *77*, 112-122; b) M. A. Davis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 189-192; c) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03531827>; d) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02769962>, visitadas el 13 de febrero de 2019.
- <sup>91</sup> J. L. Jiménez Blanco, C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *42*, 18-37.
- <sup>92</sup> a) A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684; b) C. Byrne, F. Sallas, D.K. Rai, J. Ogier, R. Darcy, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3763-3771; c) B. M. D. C. Godinho, J. R. Ogier, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, J. F. Cryan, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 640-649.
- <sup>93</sup> V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nature Commun.* **2013**, *4*, 1721.
- <sup>94</sup> A. Méndez-Ardoy, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, F. Santoyo-González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882-5894.
- <sup>95</sup> a) F. Ortega-Caballero, C. Ortiz Mellet, L. Le Gourrierc, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5143-5146; b) I. Pflueger, C. Charrat, C. Ortiz Mellet, J.M. García Fernández, C. Di Giorgio, J. M. Benito, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10037-10049.
- <sup>96</sup> L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6622-6627.

# Capítulo 2

Objetivos.



## 2. Objetivos.

Una lección general que puede ser extraída de los ejemplos descritos en el capítulo anterior es el impacto que el desarrollo de metodología de síntesis de precisión en torno a la química supramolecular con ciclodextrinas y la diversidad de aplicaciones que han podido concebirse en un breve periodo de tiempo. Sin embargo, quizá justamente por la capacidad de ofrecer soluciones creativas y a pesar de la sofisticación alcanzada, el arsenal metodológico sintético requiere seguir siendo ampliado para satisfacer la demanda de sistemas funcionales macro- y supramoleculares.

En este sentido, y enlazando con el último ejemplo ilustrativo del capítulo anterior (Esquema 1.5.),<sup>1</sup> la posibilidad de modificar sintéticamente CDs para dotarlas de una capacidad de ensamblaje en presencia de ácidos nucleicos mediante la incorporación de módulos de dimerización resulta un concepto muy atractivo para concebir sistemas de transporte inteligente para terapia génica. La incorporación del grupo aromático con una orientación precisa en la cara secundaria de  $\beta$ CD permitió la demostración del concepto y además permitió dotar al sistema de capacidad de respuesta frente al pH, ya que la dimerización está menos favorecida en medio ácido. Resulta intuitivo que el ajuste de la capacidad de autoasociación y su sensibilidad al pH son factores que van a afectar de manera importante a la dinámica del proceso de ensamblaje/desensamblaje de los CDplejos. Sin embargo, la estrategia sintética empleada demostró una versatilidad limitada para llevar a cabo estudios exhaustivos de relación entre estructura molecular, capacidad de dimerización y autoensamblaje supramolecular.

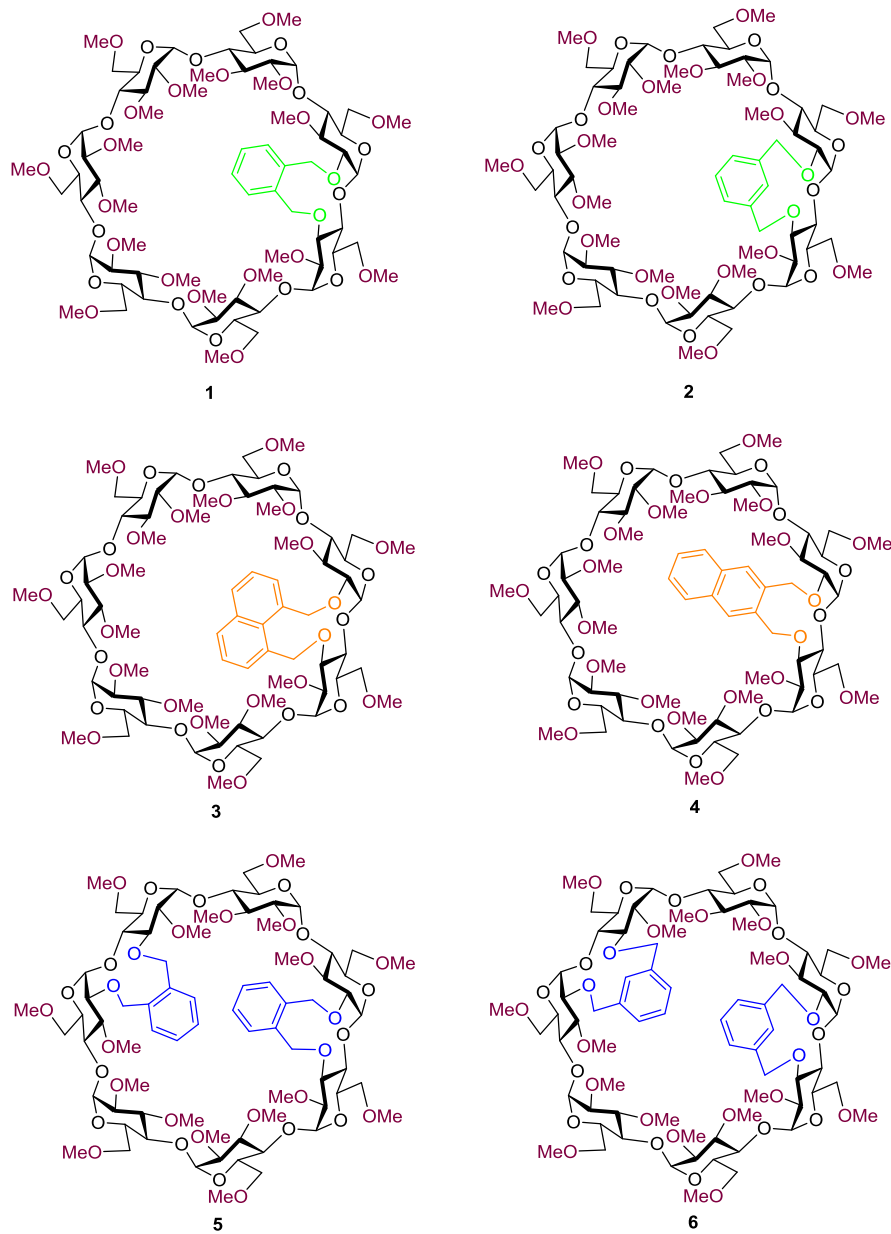
El trabajo que se desarrolla en esta Tesis tiene como objetivo general superar las limitaciones sintéticas que impiden la exploración exhaustiva de la relación estructura-actividad en sistemas autoensamblables basados en CDs

dependientes de pH. En este sentido, desde una perspectiva fundamentalmente basada en el desarrollo de metodología sintética para el control y manipulación de propiedades supramoleculares, esta Tesis ha centrado sus esfuerzos a dos niveles:

- Un primer nivel con una orientación más físico-química, en el que se ha abordado el desarrollo de una metodología sintética versátil para la incorporación de elementos de restricción conformacional que, a modo de clip, modulen la capacidad de inclusión molecular y la autoasociación de la CD. El desarrollo de esta estrategia ha permitido el acceso a una gama diversa de derivados de CD estructuralmente bien definidos, denominadas CDs con tapadera o tipo clip (*"capped"* o *"clipped"* CDs). Esta colección ha permitido desarrollar un estudio a nivel físico-químico de la influencia de la naturaleza y disposición del elemento de control conformacional en las propiedades supramoleculares del derivado de CD.
- Y un segundo nivel con una orientación más bio-física, en el que se han implementado estas herramientas de control de las interacciones supramoleculares al diseño de nueva familia de sistemas autoensamblables sensibles al entorno. Se ha pretendido con esto adaptar la estrategia sintética para la elaboración de derivados policationicos de CD con capacidad de autoensamblaje jerarquizado en presencia de ácidos nucleicos que puedan ser de aplicación en el transporte y transfección celular de material génico.

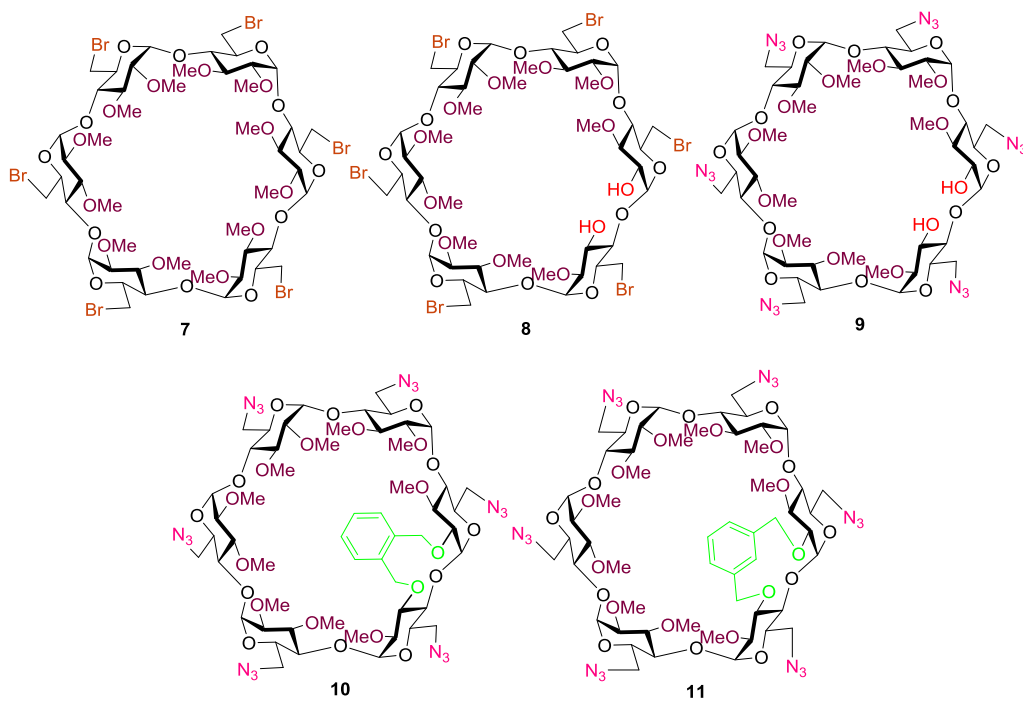
El trabajo desarrollado en esta Tesis ha dado lugar a la obtención de una nueva serie de derivados de CD que no habían sido descritos con anterioridad, y cuyas estructuras se describen a continuación:

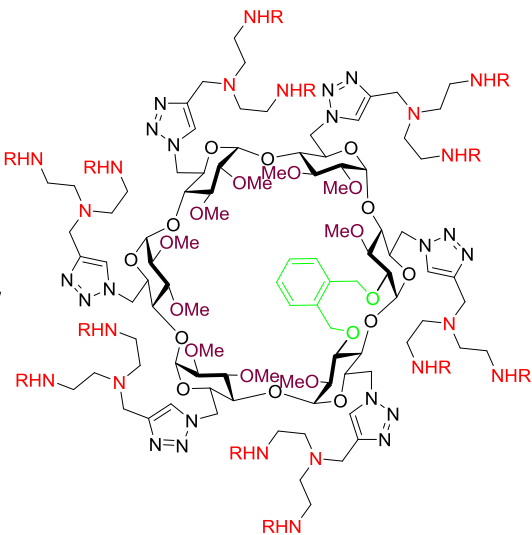
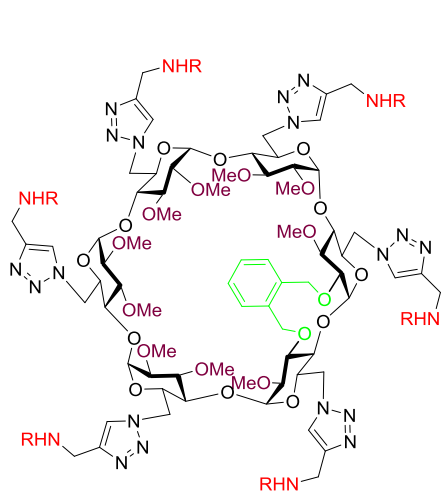
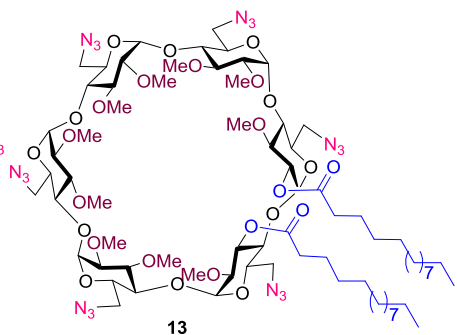
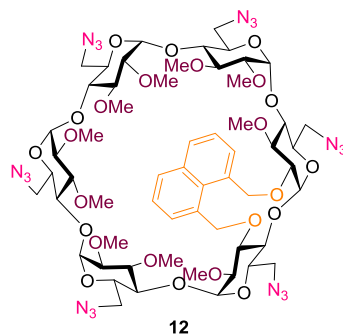
Ciclodextrinas con sustituyentes tipo clip.

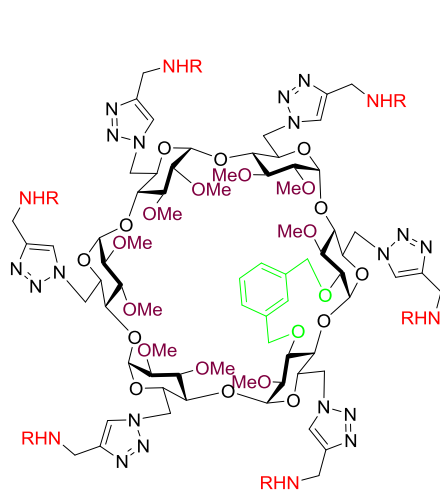




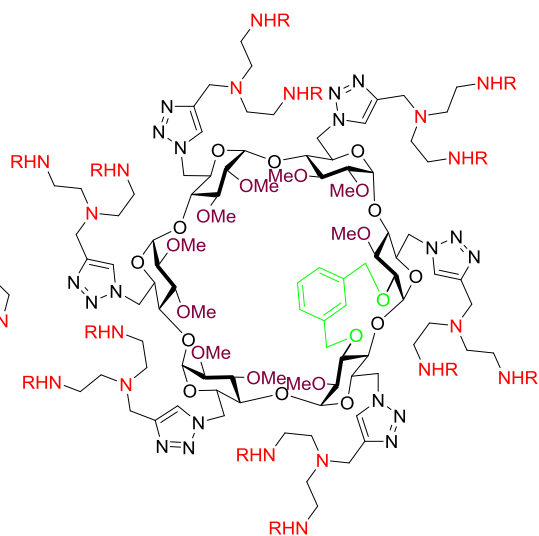
**Derivados de  $\alpha$ -ciclodextrina facialmente diferenciados.**



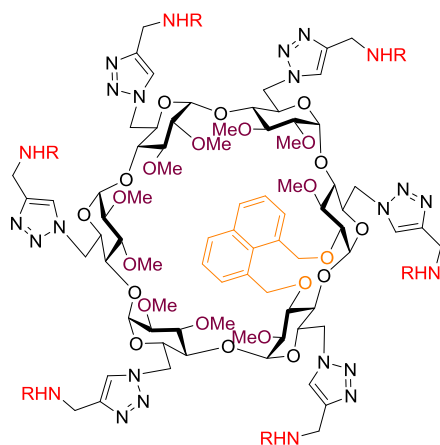




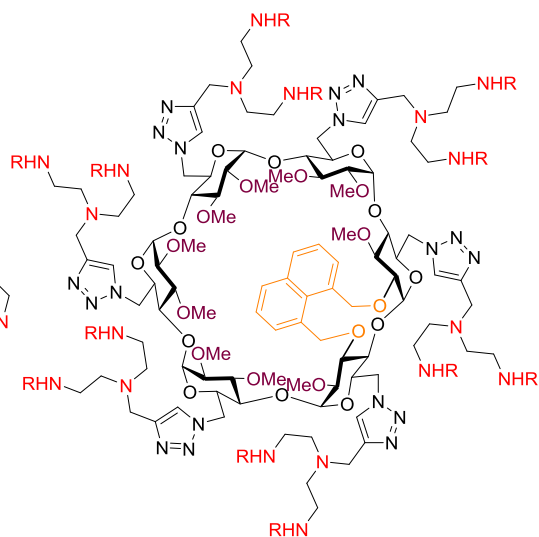
18, R = Boc  
19, R = H·HCl



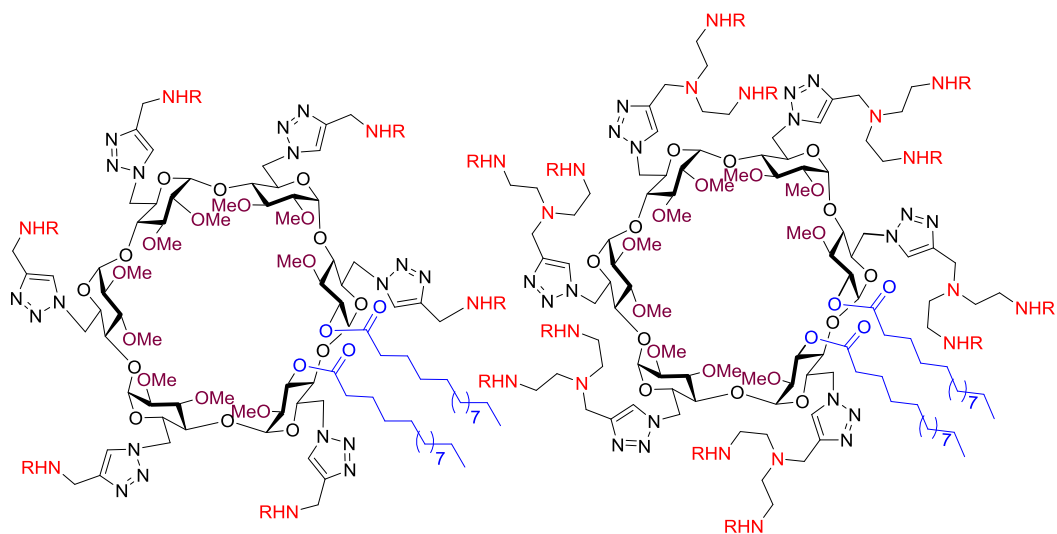
20, R = Boc  
21, R = H·HCl



22, R = Boc  
23, R = H·HCl

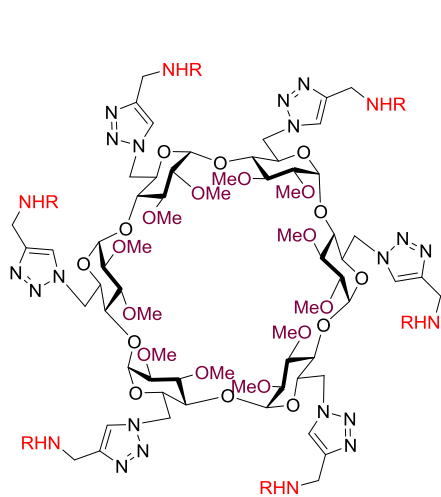


24, R = Boc  
25, R = H·HCl

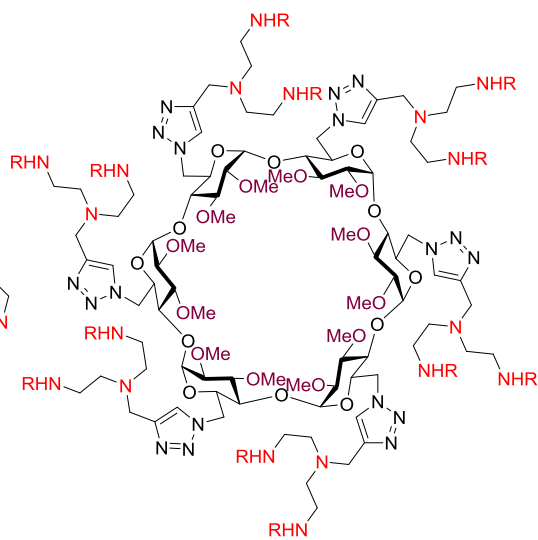


26, R = Boc  
27, R = H·HCl

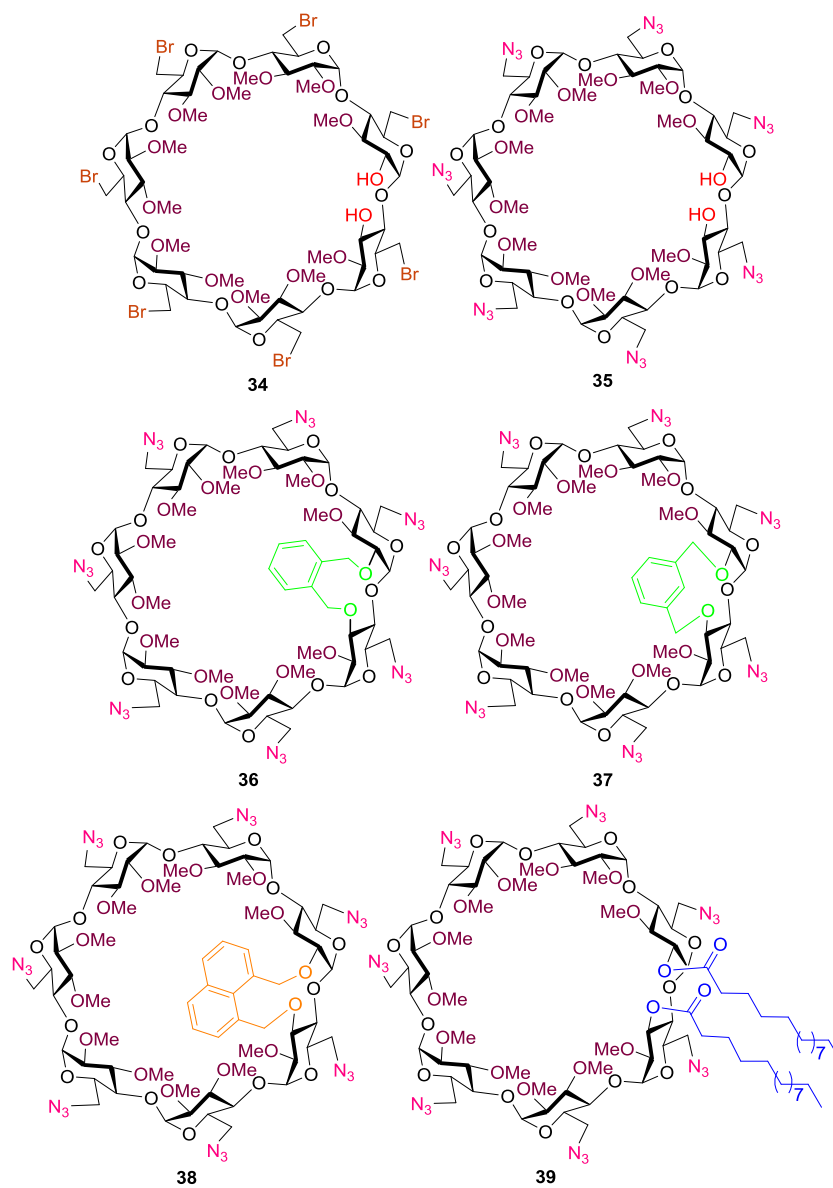
28, R = Boc  
29, R = H·HCl

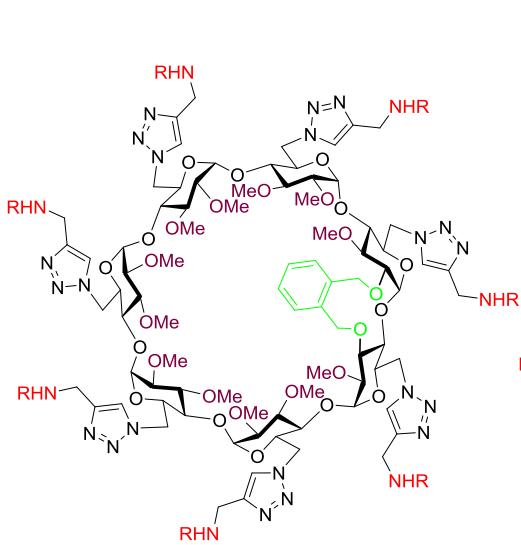


30, R = Boc  
31, R = H·HCl

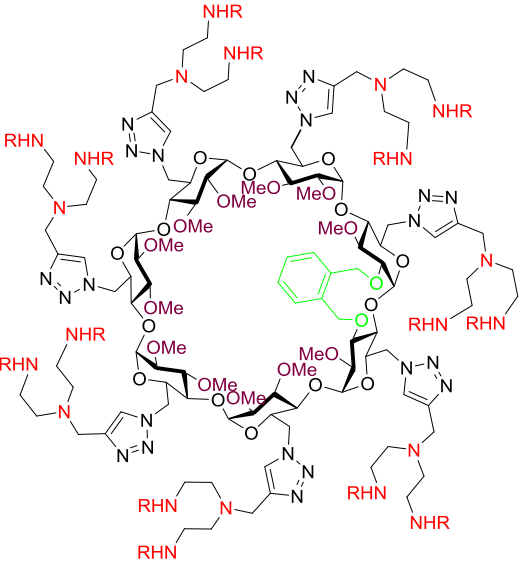


32, R = Boc  
33, R = H·HCl

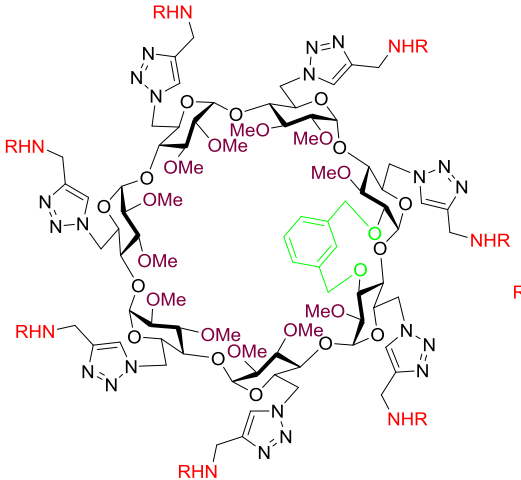
**Derivados de  $\beta$ -ciclodextrina facialmente diferenciados.**



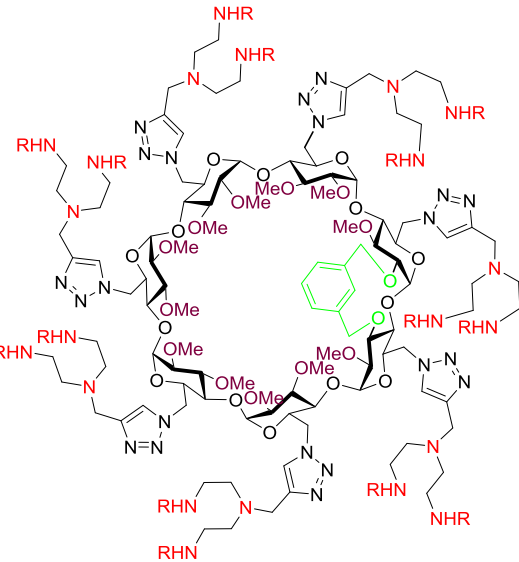
40, R = Boc  
41, R = H·HCl



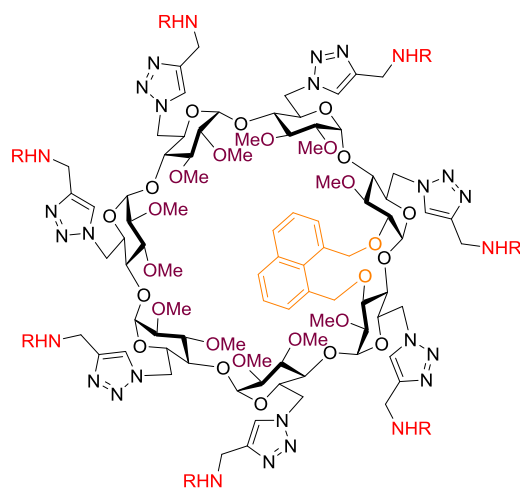
42, R = Boc  
43, R = H·HCl



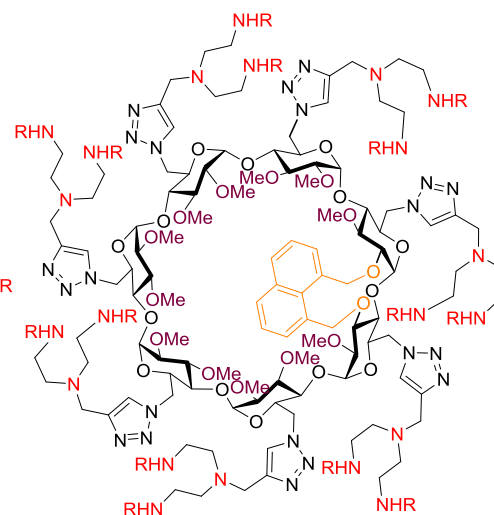
44, R = Boc  
45, R = H·HCl



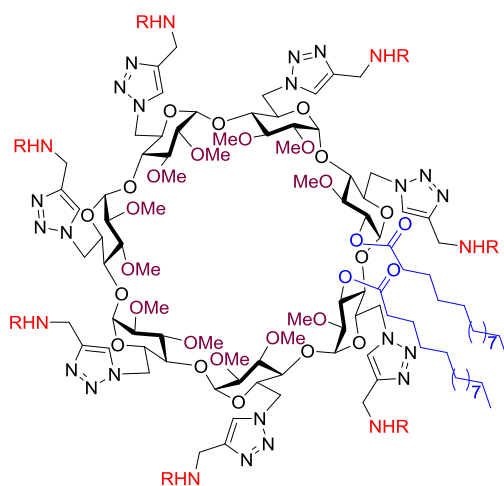
46, R = Boc  
47, R = H·HCl



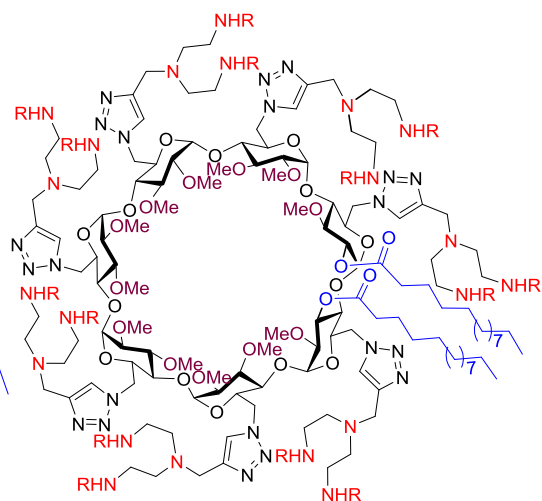
48, R = Boc  
49, R = H·HCl



50, R = Boc  
51, R = H·HCl



52, R = Boc  
53, R = H·HCl



54, R = Boc  
55, R = H·HCl

---

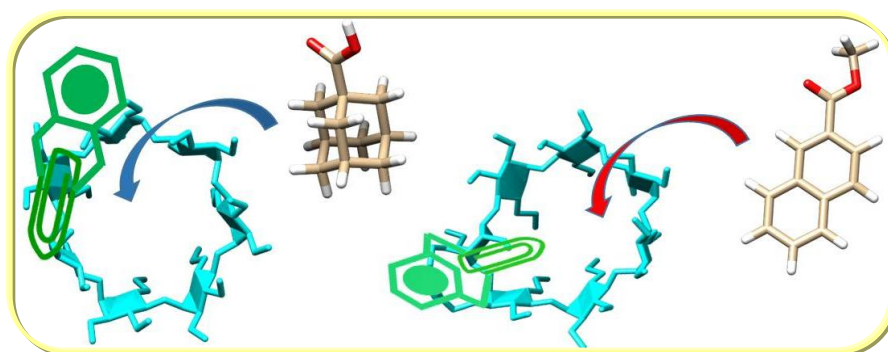
<sup>1</sup> L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6622-6627.



# Capítulo 3

## Ciclodextrinas con sustituyentes de xilileno tipo clip: control de las propiedades de autoasociación e inclusión y modulación de la conformación.

La incorporación a la estructura de la  $\beta$ -ciclodextrina de un clip de *o*- o *m*-xilileno uniendo dos subunidades de D-glucopiranosas contiguas a través de las posiciones secundarias O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup> permite modular su conformación, de troncocono circular a ovoide. Esta estrategia se puede utilizar para modular la capacidad de inclusión en la cavidad, así como de dimerización en agua.



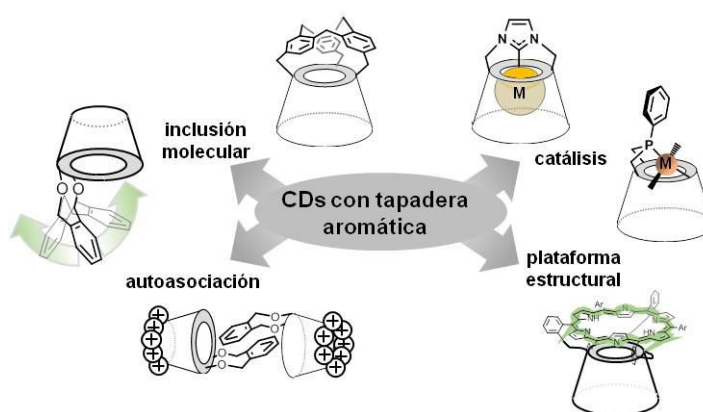
T. Neva, T. Carmona, J. M. Benito, C. Przybylski, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 5588-5597.



### 3. Ciclodextrinas con sustituyentes de xilileno tipo clip: control de las propiedades de autoasociación e inclusión y modulación de la conformación.

#### 3.1. Antecedentes bibliográficos.

La posibilidad de incorporar segmentos aromáticos a la estructura rígida de la CD es particularmente atractiva. Estos elementos pueden desempeñar el papel de *muros* rígidos para construir cavidades permanentes, actuar como sondas que transmitan propiedades de interacción o detección no covalente, promover la interacción supramolecular con otras moléculas iguales o la asociación con terceras especies, permitiendo implementar varios niveles de organización.<sup>1</sup>



**Figura 3.1.** Aplicaciones de las CDs con sustituyentes de tipo “tapadera”.

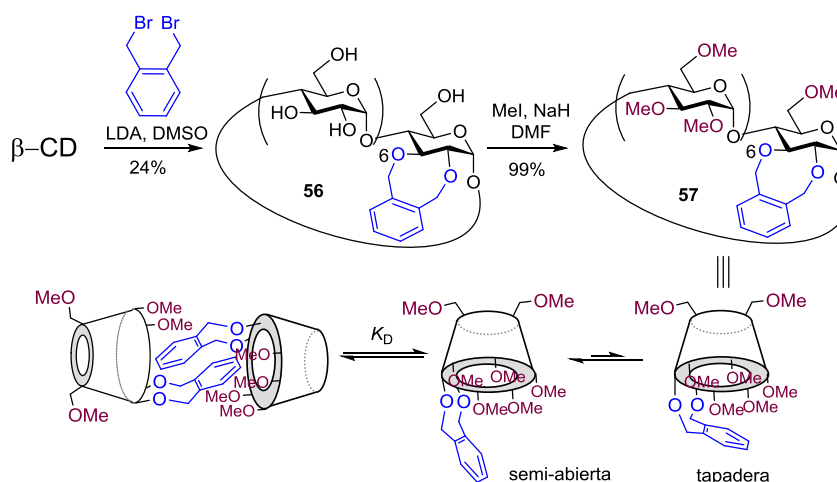
En la mayoría de los ejemplos estudiados, el elemento aromático está unido al ciclooligosacárido a través de una única posición y esto, en la mayor parte de los casos, le permite conservar una movilidad considerable.<sup>2</sup> Sin embargo, los derivados con uniones dobles presentan movilidad más restringida

y son, en principio, más adecuados para un control preciso de la conformación molecular.<sup>3</sup> Dependiendo de la disposición relativa de los puntos de unión a la CD, se han descrito arquitecturas similares a la de una tapadera ("cap") o a una bisagra ("hinge"), con diversos grados de flexibilidad y múltiples aplicaciones en catálisis, complejación supramolecular o sistemas autoensamblables (Figura 3.1.).<sup>4</sup>

En trabajos anteriores del grupo de investigación se puso a punto una metodología sintética que permite incorporar regioselectivamente un puente de *o*-xilileno entre las posiciones O-2 y O-3 de una misma unidad de glucosa en  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ CD.<sup>5</sup> La síntesis del derivado permetilado de  $\beta$ CD **57** con un segmento de *o*-xilileno unido a las posiciones secundarias O-2' y O-3' se puede realizar a partir de la  $\beta$ CD natural a través de una alquilación regioselectiva con el sustituyente aromático ( $\rightarrow$  **56**), seguido de permetilación del resto de los hidroxilos libres (Figura 3.2.). Ajustando las condiciones de reacción, a pesar del gran número de isómeros que podrían formarse, se puede conseguir regioselectivamente **57** con un 24% de rendimiento. La eficacia de esta reacción está probablemente condicionada por la distancia entre las posiciones secundarias contiguas de una unidad de glucosa (2.84 Å) que es complementaria a la del grupo *o*-xilileno. Sin embargo, justo por este motivo, esta estrategia sintética queda limitada al anillo de *o*-xilileno.

La doble unión del grupo aromático a la cara secundaria de la CD, a modo de bisagra, permite que el anillo aromático pueda adoptar una conformación de tipo tapadera o una completamente abierta. En el caso de  $\beta$ CD, el equilibrio se encuentra desplazado hacia una disposición semi-abierta del anillo aromático que restringe la flexibilidad conformacional y evita la autoinclusión (Figura 3.2.). Como resultado, las constantes de inclusión ( $K_a$ ) en agua de octil  $\beta$ -D-glucopiranosido (350 M<sup>-1</sup>) y 2-naftoato de metilo (281 M<sup>-1</sup>) aumentan respecto a las del análogo permetilado TRIMEB (115 y 101 M<sup>-1</sup>,

respectivamente). El aumento es, probablemente, debido al establecimiento de interacciones adicionales de la plataforma aromática con los anillos del huésped y a la desolvatación más eficaz en la entrada de la cavidad de la CD. Por otra parte, la tendencia del derivado xililenado de CD a dimerizar en medio acuoso se explica en base a la reducción de la exposición de los segmentos aromáticos al entorno polar.<sup>6</sup> Esta característica ha resultado especialmente interesante como herramienta para promover ordenamientos reversibles en medio acuoso, así como para controlar la formación y disociación de complejos con ácidos nucleicos.<sup>7</sup> Sin embargo, la limitación de la estrategia sintética a la incorporación del anillo de *o*-xilileno restringe la posibilidad de producir una diversidad estructural suficientemente amplia como para realizar estudios exhaustivos de relación estructura-actividad.



**Figura 3.2.** Síntesis del derivado **57** y representación de su equilibrio de dimerización.

La disponibilidad de una estrategia sintética para la preparación de derivados de ciclodextrina con pares de hidroxilos de la cara secundaria diferenciados ( $O$ -2<sup>I</sup> y  $O$ -3<sup>II</sup>)<sup>8</sup> se ha aprovechado en esta Tesis para desarrollar una

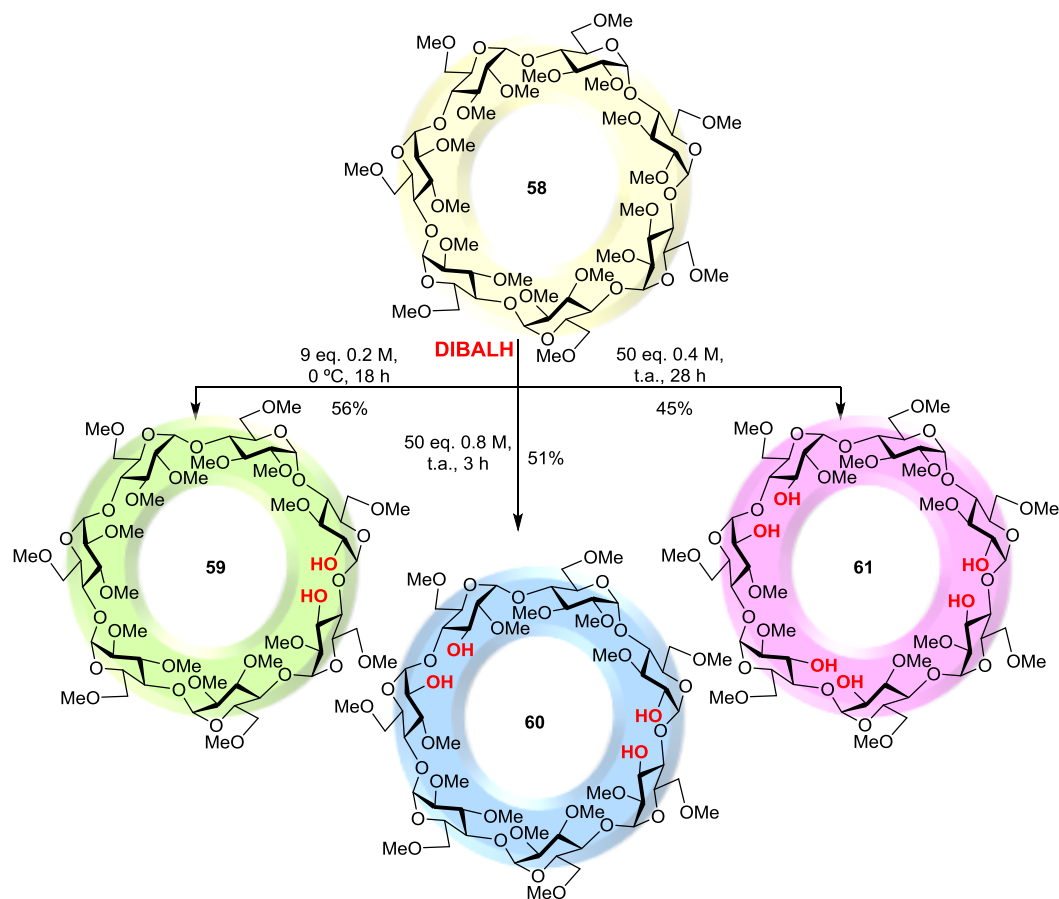
metodología que permita explorar la incorporación de elementos aromáticos de diferente geometría (*o*- y *m*-xilileno) y su influencia sobre las propiedades de inclusión y autoensamblaje de los correspondientes derivados de CD.

### 3.2. Resultados y discusión.

#### 3.2.1. Síntesis de ciclodextrinas con sustituyentes de xilileno tipo clip.

A partir del estudio de la reactividad de azúcares frente al triisobutilaluminio (TIBAL), Sinaÿ observó que hidruros estéricamente congestionados de Aluminio (p.e. hidruro de diisobutilaluminio, DIBAL·H), empleado con asiduidad en la reducción de ácidos carboxílicos, ésteres y nitrilos, es capaz de desproteger CDs per-O-benciladas en posiciones muy concretas.<sup>9</sup> El potencial de esta metodología para acceder a derivados de CDs selectivamente funcionalizados en la cara primaria ha sido ampliamente utilizado.<sup>10</sup> La reacción ha sido racionalizada y optimizada para la desalquilación reductiva de hidroxilos protegidos con otros grupos (TBDMS o metilo), cada una de ellas con un patrón de regioselectividad particular dependiente del tipo de ciclodextrina, posición y volumen estérico del agente reductor. Así, el mismo DIBAL·H muestra una clara selectividad por desproteger pares de hidroxilos de la cara secundaria en disposición relativa O-2<sup>I</sup>–O-3<sup>II</sup> de derivados permetilados de CD.<sup>11</sup> Sin embargo, el empleo de esta reacción para la introducción de elementos funcionales en la plataforma de CD ha sido menos explotado.

En esta Tesis se hace uso de la metodología desarrollada por Sollogoub para la desprotección regioselectiva de las posiciones O-2 y O-3 de unidades de glucosa contiguas en la CD per-O-metilada (**58**).<sup>12</sup>



**Esquema 3.1.** Desprotección regioselectiva de la  $\beta$ CD permitilada **58** empleando DIBAL-H descrita por Sollogoub y colaboradores.

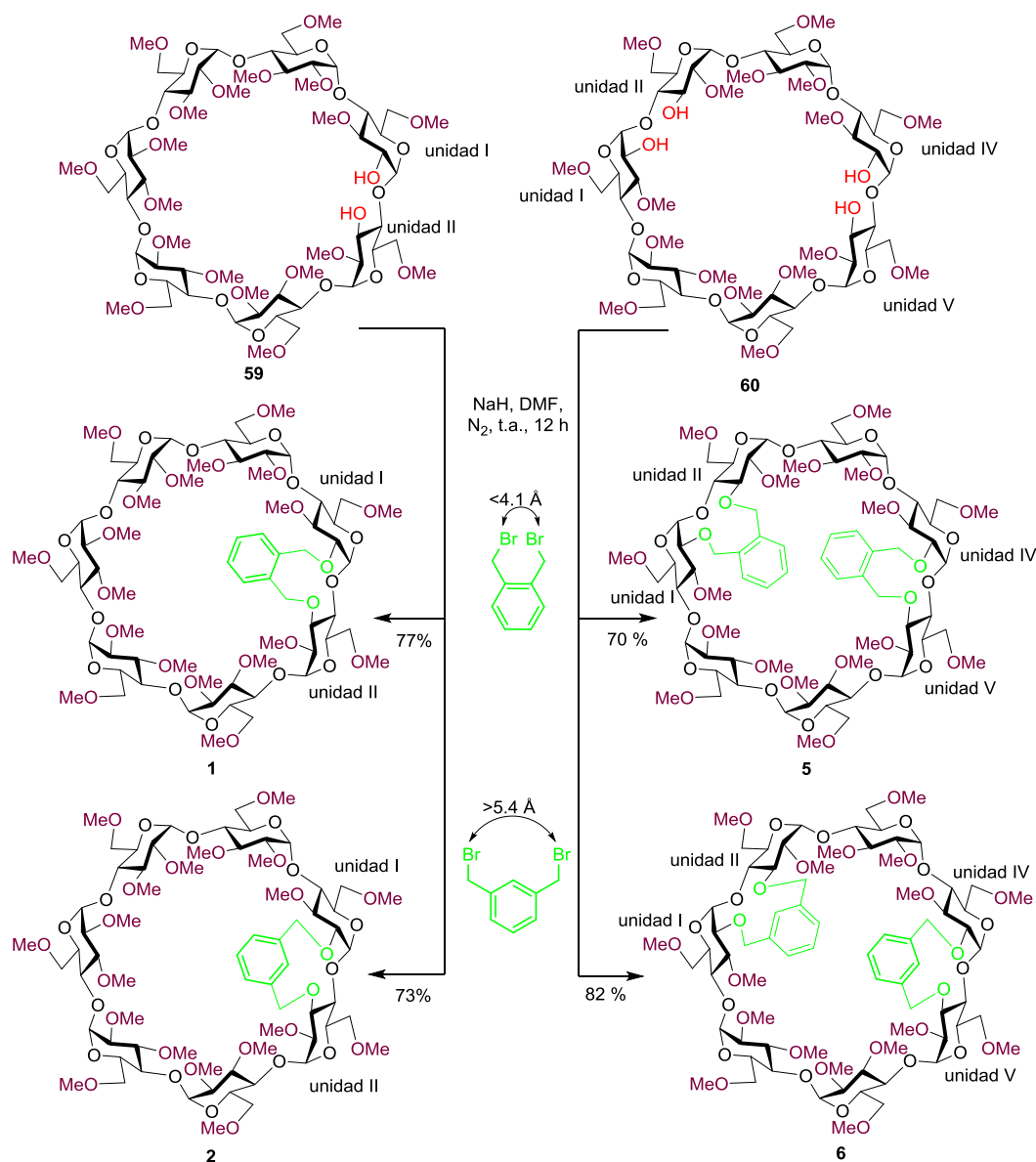
En el mecanismo propuesto de desprotección primero se produce la quelatación del aluminio de una molécula de DIBAL-H por los oxígenos de las posiciones O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup>. Una segunda molécula de reactivo interviene formando un complejo con el O-3<sup>II</sup>, menos impedido al estar situado fuera de la cavidad, y provocando la desprotección de esta posición. Posteriormente se coordina de forma intramolecular el oxígeno interglucosídico y la reducción del grupo metilo a metano que proporciona el correspondiente diol (**59**).<sup>8</sup> Si se aumenta la cantidad

del reactivo reductor o la reacción se mantiene a temperatura ambiente durante más tiempo se puede llegar a obtener productos de desprotección adicional, pero siempre en las posiciones más lejanas posibles a las de desprotección inicial. Así, aumentando el número de equivalentes de agente reductor está descrita la obtención de productos regioselectivamente tetra- ( $O-2^{I,IV}$  y  $O-3^{II,V}$ , **60**) y hexadesmetilados ( $O-2^{I,IV,VI}$  y  $O-3^{II,V,VII}$ , **61**) (Esquema 3.1.).<sup>8a</sup>

La reacción de **59** en DMF en presencia de NaH con  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*- y *m*-xilileno condujo a los éteres cíclicos **1** y **2** con rendimientos del 77 y 73% respectivamente (Esquema 3.2.).

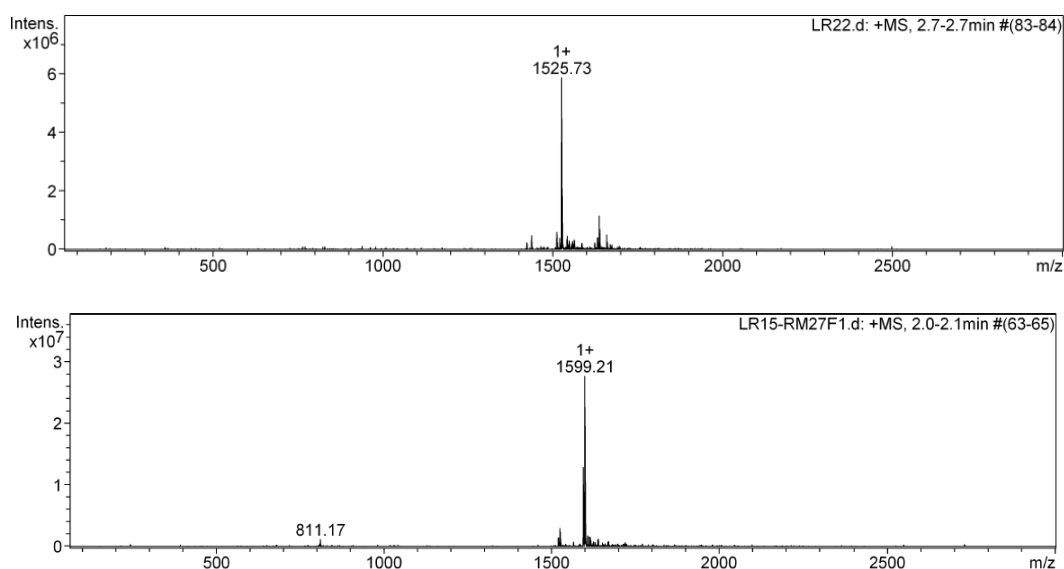
Siguiendo una estrategia sintética similar, el producto tetradesmetilado (**60**) permite la preparación de CDs doblemente funcionalizadas que incorporan dos anillos de *o*-xilileno (**5**) o *m*-xilileno (**6**) a dos posiciones secundarias de unidades de glucosa contiguas ( $O-2^I-O-3^{II}$ ,  $O-2^{IV}-O-3^V$ ) con rendimientos del 70 y 82%, respectivamente (Esquema 3.2.).





**Esquema 3.2.** Síntesis de los derivados de  $\beta$ CD mono- y difuncionalizados con anillos de *o*- y *m*-xilileno **1**, **2**, **5** y **6**.

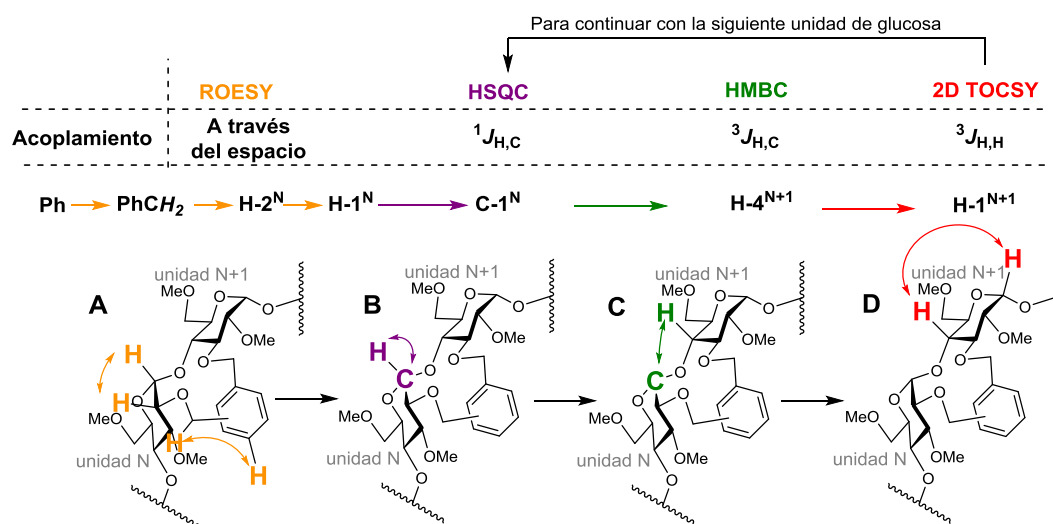
Es interesante destacar la eficiencia de la reacción de bis-alquilación, independientemente del derivado de CD de partida o la geometría del xileno. En ningún caso se observan productos intermedios de alquilación parcial o subproductos de doble alquilación. En la Figura 3.3. se muestran los espectros de masas en modo ESI de los crudos de reacción correspondientes a los compuestos mono- y di-xililenados **1** y **6**, en los que se observa un solo producto en cada caso. Los picos a relaciones de  $m/z$  1525.7 (arriba) y 1599.2 (abajo) corresponden, respectivamente, a los iones pseudomoleculares  $[M + Na]^+$ . Este hecho sugiere que, una vez ocurre la primera alquilación en la posición más fácilmente desprotonable, la segunda alquilación que cierra el ciclo ocurre de forma mucho más rápida.



**Figura 3.3.** Espectros de masas en modo ESI de los crudos de reacción de **1** (arriba) y **6** (abajo).

### 3.2.2. Elucidación estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear.

La anisotropía inducida al incorporar los anillos aromáticos en las estructuras de **1** y **2** provoca una dispersión en las señales en los espectros de  $^1\text{H}$  RMN que dificulta su asignación. Con objeto de asignar la totalidad de las señales de los espectros de RMN se han combinado experimentos de RMN mono- ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN) y bidimensional (2D TOCSY, ROESY, HMBC, HSQC), registrados a campo alto (600 MHz) en MeOD (**5**) o  $\text{D}_2\text{O}$  (**1**, **2** y **6**). Estos experimentos se han combinado generando una rutina de asignación que está ilustrada en la Figura 3.4. y que se describe a continuación.

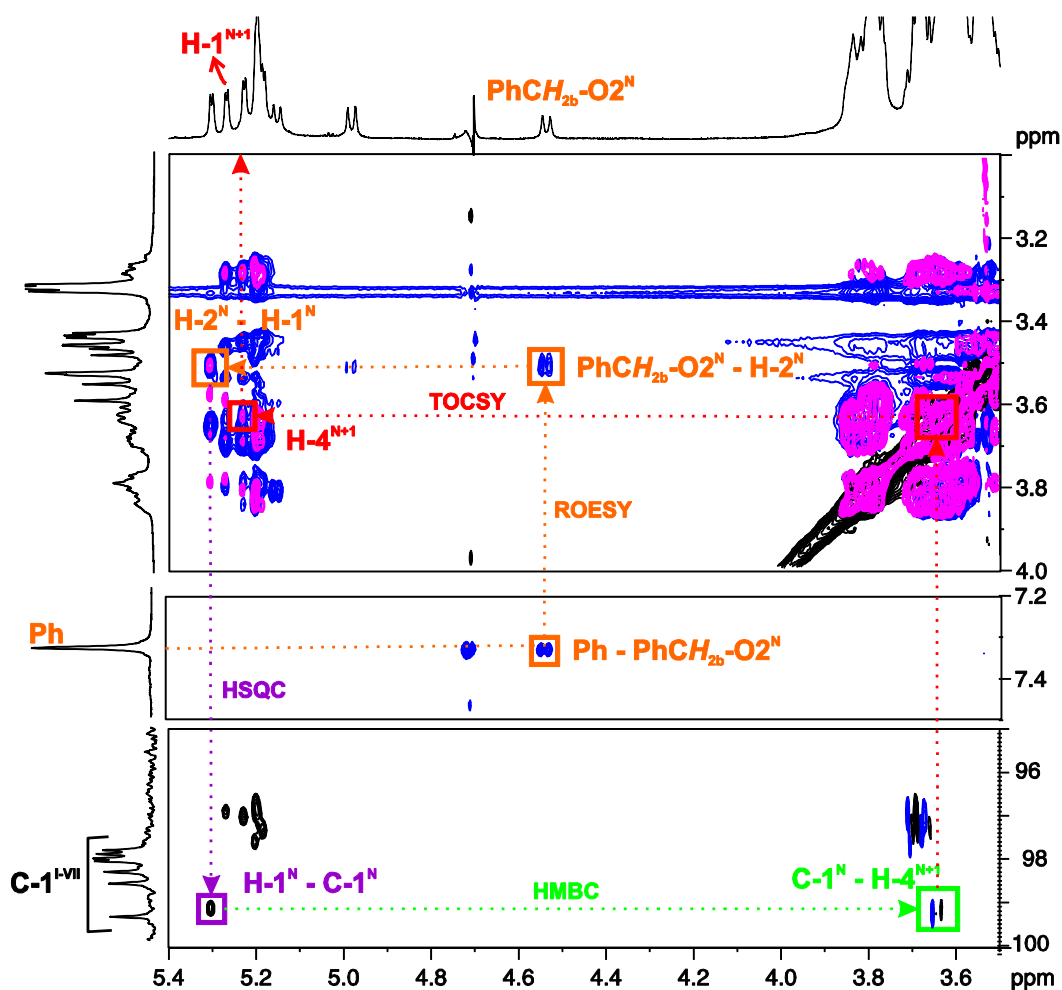


**Figura 3.4.** Combinación de experimentos de RMN diseñada para la asignación completa de las señales.

En un primer paso, los experimentos ROESY, de correlación a través del espacio, permiten identificar las señales de las unidades de glucosa unidas al

anillo aromático. Los protones aromáticos (Ph) tienen contactos ROE con los protones bencílicos ( $\text{PhCH}_2$ ) y estos a su vez, con H-2 y H-1 de la unidad de glucosa N (Figura 3.4.A. y Figura 3.5. línea naranja). Los experimentos de HSQC muestran el acoplamiento escalar entre  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  a un enlace (Figura 3.4.B. y Figura 3.5. línea morada) y permiten identificar el  $\text{C-1}^{\text{N}}$  de la unidad de glucosa sustituida. A partir de aquí, y a través de experimentos HMBC, de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  a múltiples enlaces, se pueden correlacionar  $\text{C-1}^{\text{N}}$  con  $\text{H-4}^{\text{N+1}}$  de la siguiente unidad de glucosa (Figura 3.4.C. y Figura 3.5. línea verde). Alternativamente, la correlación entre unidades de glucosa contiguas puede realizarse (o confirmarse) a través del ROE esperado entre  $\text{H-1}^{\text{N}}$  y  $\text{H-4}^{\text{N+1}}$  o el HMBC a tres enlaces entre  $\text{H-1}^{\text{N}}$  y  $\text{C-4}^{\text{N+1}}$ . Una vez identificado  $\text{H-4}^{\text{N+1}}$  a través del experimento TOCSY, se pueden identificar el resto de señales pertenecientes al mismo sistema de espín mediante acoplamiento escalar (Figura 3.4.D. y Figura 3.5. línea roja).

Una vez identificado  $\text{H-1}^{\text{N+1}}$ , es posible repetir el ciclo de correlaciones para identificar las señales de la siguiente unidad de glucosa. Se reinicia así el ciclo de experimentos bidimensionales: HSQC  $\rightarrow$  HMBC (y confirmación por ROESY)  $\rightarrow$  TOCSY para asignar las señales pertenecientes a la siguiente unidad de glucosa (N+2) (Figura 3.4.).



**Figura 3.5.** Regiones seleccionadas de los espectros de correlación homonuclear ROESY/TOCSY (arriba y centro) y heteronuclear HSQC/HMBC (abajo) de **1** (600 MHz, D<sub>2</sub>O). Las líneas punteadas indican la secuencia de experimentos implementados para la asignación.

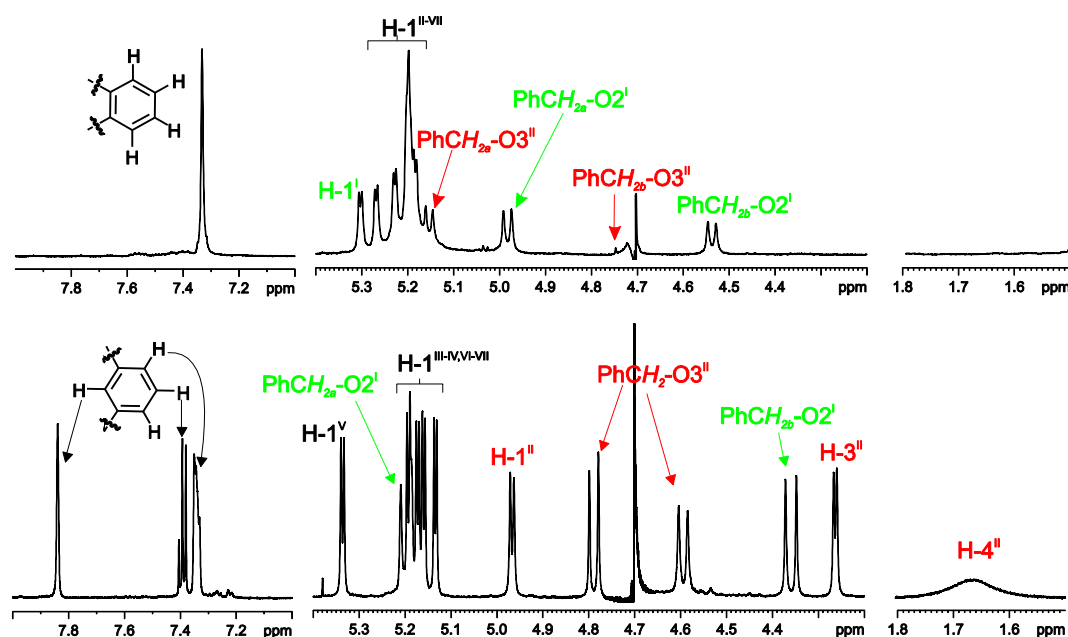
Los protones de los grupos metilo pueden asignarse utilizando HMBC a tres enlaces para correlacionar su carbono con el protón de la posición metilada ( $^3J_{H,C}$ ).

Para la mayoría de los compuestos, el solapamiento de señales en los espectros provoca la necesidad de combinar los experimentos descritos siguiendo secuencias alternativas. En el anexo adjunto a esta Tesis se encuentra un ejemplo detalladamente descrito de la asignación de señales de los espectros del derivado **6**.

### 3.2.3. Estudio de las propiedades conformacionales.

La incorporación de sustituyentes unidos a través de dos enlaces a unidades de glucosa contiguas deben inducir un cambio conformacional y una restricción de movilidad muy dependientes de la geometría del sustituyente. Como consecuencia, es de esperar que las propiedades supramoleculares difieran en gran medida en función del tipo de sustituyente.

El estudio por RMN de los espectros de **1** y **2** en D<sub>2</sub>O son una prueba ilustrativa de esto. Los espectros de  $^1H$  RMN de los derivados xililenados **1** y **2**, registrados a 600 MHz en D<sub>2</sub>O, muestran diferencias significativas. La dispersión de señales relativamente estrecha en el espectro de  $^1H$  RMN del compuesto funcionalizado con *o*-xilileno **1** (Figura 3.6. arriba) contrasta con la anisotropía inducida por el puente *m*-xilileno en el derivado **2** (Figura 3.6. abajo).

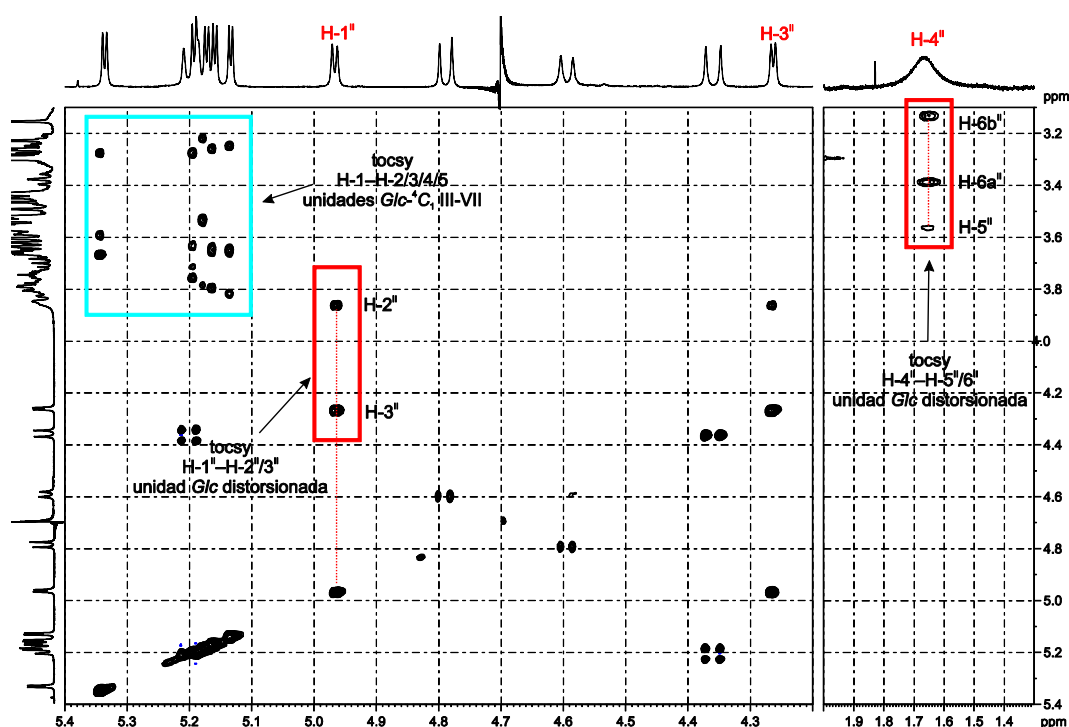


**Figura 3.6.** Regiones seleccionadas de los espectros de  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de **1** (arriba) y **2** (abajo).

Los experimentos de TOCSY permiten identificar las señales de los protones H-2, H-3, H-4 y H-5 que presentan una disposición axial en todas las unidades de glucosa del derivado **1**, característica de una conformación de silla  $^4\text{C}_1$  en glucosa. Las constantes de acoplamiento vecinal protón-protón ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) muestran valores en el rango de 9-10 Hz, consistentes con esa conformación. Los experimentos ROESY no mostraron señales de cruce entre los protones aromáticos y los de las unidades de glucosa, lo que apunta a una disposición relativamente abierta del sustituyente de *o*-xilileno, sin que se produzcan fenómenos de inclusión del anillo aromático en la cavidad.

Por el contrario, en el caso del derivado **2**, los experimentos de RMN bidimensionales indican una distorsión significativa en la unidad de glucosa II (la sustituida en O-3). Los experimentos de correlación homonuclear COSY y

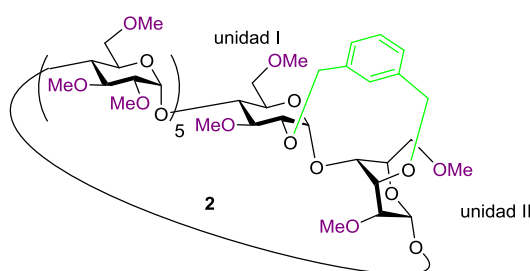
TOCSY (Figura 3.7.) no mostraron acoplamiento escalar entre los protones  $H-3''$  y  $H-4''$ , lo que sugiere una conformación anómala, lejos de la conformación  ${}^4C_1$ , y más cerca de un ángulo diedro ( $\angle_{H-3-C-3-C-4-H-4}$ ) de unos  $90^\circ$ .<sup>13</sup> En consecuencia, los protones de esta unidad de glucosa constituyen dos sistemas de espín independientes: uno para los protones  $H-1''-H-2''-H-3''$  y otro para los protones  $H-4''-H-5''-H-6''$ , respectivamente (Figura 3.7.). En general, los desplazamientos químicos de los protones de esta unidad de glucosa son anómalos, apareciendo  $H-3''$  y  $H-4''$  desplazados a campo muy bajo (4.25 ppm) y alto (1.65 ppm), respectivamente.



**Figura 3.7.** Espectro TOCSY RMN (600 MHz,  $D_2O$ ) de **2**. Los contactos TOCSY de las unidades de glucopiranosilo  ${}^4C_1$  se resaltan en el recuadro azul. Los dos conjuntos de señales de cruce ( $H-1''-H-2''-H-3''$  y  $H-4''-H-5''-H-6_{a,b}''$ ) se resaltan en el recuadro rojo.



Además, las señales de esta unidad de glucosa son considerablemente más anchas que las del resto de la molécula, probablemente debido a un intercambio conformacional relativamente lento entre la conformación de la silla distorsionada y una conformación de tipo pseudo-sobre que se aplanan en la región alrededor del vértice C-4<sup>II</sup> para satisfacer los requerimientos geométricos impuestos por el puente de *m*-xilileno (Figura 3.8.).

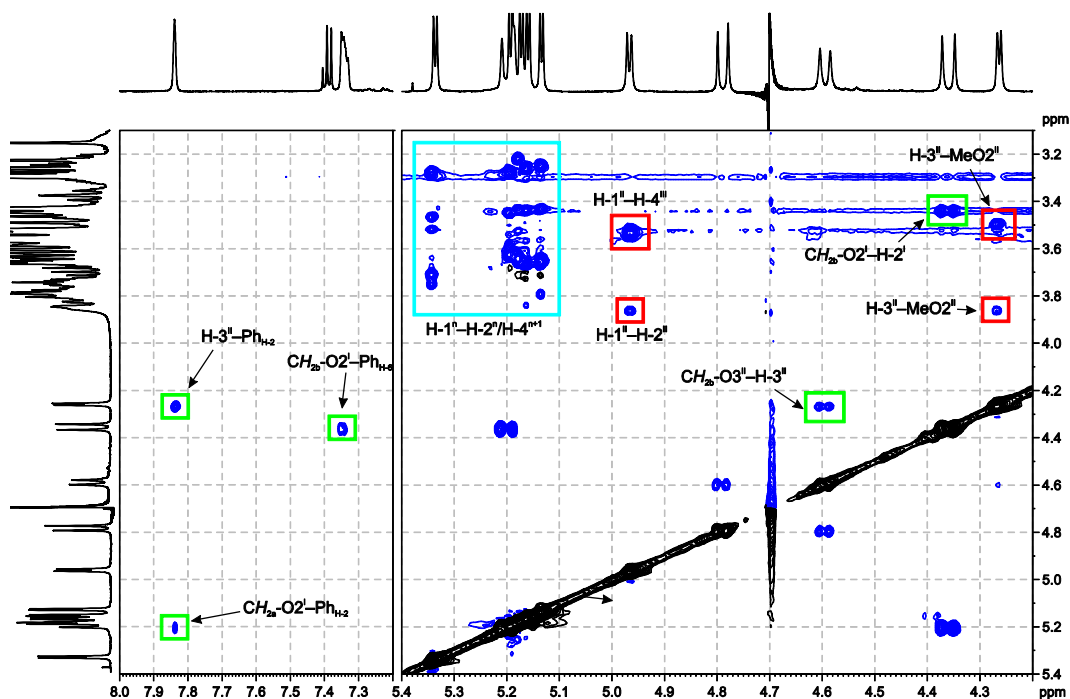


**Figura 3.8.** Estructura propuesta del compuesto **2**, con la unidad de glucosa II en conformación de silla  ${}^1C_4$  de acuerdo con los datos de RMN.

Un aumento de la temperatura de registro de los espectros de RMN redujo la anchura de las señales correspondientes a H-3<sup>II</sup> y H-4<sup>II</sup>, lo que está de acuerdo con un intercambio conformacional más rápido. En cualquier caso, el conjunto de datos espectroscópicos apoyan la hipótesis de que el clip de *m*-xilileno, al requerir una mayor distancia entre los átomos O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup> (5.51 Å), provoca una distorsión de la conformación de esta unidad de glucosa de silla  ${}^4C_1$  a  ${}^1C_4$ .

Los cambios en el desplazamiento de algunas señales se relacionan con la orientación de esos protones respecto al anillo aromático. Normalmente, los protones que se disponen por encima o por debajo del anillo se apantallan y aquellos situados en el mismo plano se desapantallan. El desplazamiento a

campo alto de las señales de H-1<sup>I</sup> y H-4<sup>II</sup> y a campo bajo de la señal de H-3<sup>II</sup> de **2** ( $\delta_{\text{H-1(I)}} = 3.84$  ppm,  $\delta_{\text{H-4(II)}} = 1.65$  ppm,  $\delta_{\text{H-3(II)}} = 4.27$  ppm, Figura 3.6. abajo y Figura 3.7.) en comparación con las señales de **1** ( $\delta_{\text{H-1(I)}} = 5.3$  ppm,  $\delta_{\text{H-4(II)}} = 3.71$ -3.65 ppm,  $\delta_{\text{H-3(II)}} = 3.68$ -3.56 ppm; Figura 3.6. arriba) son compatibles con el cambio conformacional propuesto. Se observa una disminución de la constante de acoplamiento entre H-2<sup>II</sup> y H-3<sup>II</sup> en **2** ( $J_{2,3} = 4.0$  Hz) análoga a la descrita para la unidad <sup>1</sup>C<sub>4</sub> de la 3<sup>I</sup>,6<sup>I</sup>-anhidro- $\beta$ CD permetilada.<sup>14</sup> Además, el espectro ROESY de **2** (Figura 3.9.) mostró señales de cruce muy intensas entre el protón aromático apical, H-3<sup>II</sup> y uno de los protones del grupo metileno bencílico unido en la posición O-2<sup>I</sup>, lo que sugiere que el clip de xilileno adopta una conformación que se orienta y acerca al protón H-3<sup>II</sup>. La conformación distorsionada de la unidad II de glucopiranosilo queda confirmada por los contactos ROE existentes entre los protones H-2<sup>II</sup>/H-3<sup>II</sup> y H-3<sup>II</sup>/MeO-2<sup>II</sup>, que no se observan para el resto de las unidades de glucosa (I y III-VII). Los contactos ROE relevantes en el anillo de xilileno se resaltan en verde en la Figura 3.9.



**Figura 3.9.** Espectro de RMN 2D ROESY (600 MHz, D<sub>2</sub>O) de **2**. Los contactos ROE entre H-1<sup>n</sup> y H-2<sup>n</sup>/H-4<sup>n+I</sup> en las unidades de glucopiranosas con configuración <sup>4</sup>C<sub>1</sub> se resaltan en el recuadro azul. Los contactos ROE entre H-1<sup>II</sup> y H-2<sup>II</sup>/H-4<sup>III</sup> se destacan en los recuadros rojos.

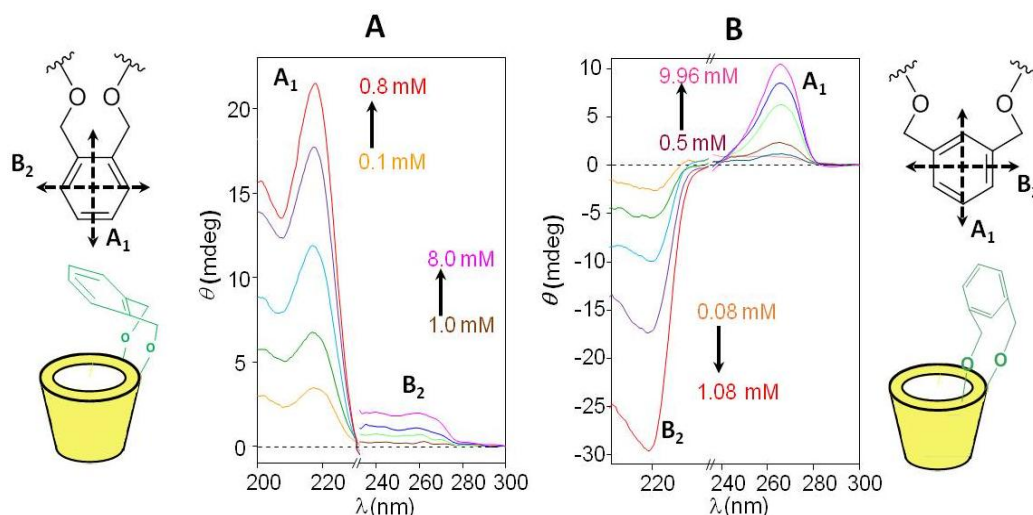
Los espectros de RMN de **6** muestran el desplazamiento a campo bajo de H-2<sup>II,V</sup> y H-3<sup>II,V</sup>, un fuerte apantallamiento de H-1<sup>I,IV</sup> y H-4<sup>II,V</sup> y una multiplicidad de señales similares a la de su homólogo mono-*m*-xililenado **2**. Estas evidencias espectroscópicas están de acuerdo con el cambio conformacional de las unidades de glucosa sustituidas en O-3 (II y V). Los de **5** muestran todas las unidades de glucosa en conformación <sup>1</sup>C<sub>4</sub> asemejándose a su homólogo mono-*o*-xililenado **1**.

*Estudios de dicroísmo circular.*

Con objeto de profundizar en las propiedades conformacionales de **1** y **2** se han llevado a cabo, en colaboración con el Prof. F. Mendicuti (Universidad de Alcalá de Henares), un estudio de sus espectros de dicroísmo circular en disolución acuosa a 25 °C.

Al presentar un cromóforo aromático unido de manera covalente a la CD, la señal de dicroísmo circular va a ser dependiente tanto de la conformación del cicooligosacárido como de la flexibilidad de la unión entre el clip de *o*- o *m*-xilileno y la CD lo que permitirá determinar la localización relativa del anillo de xilileno.

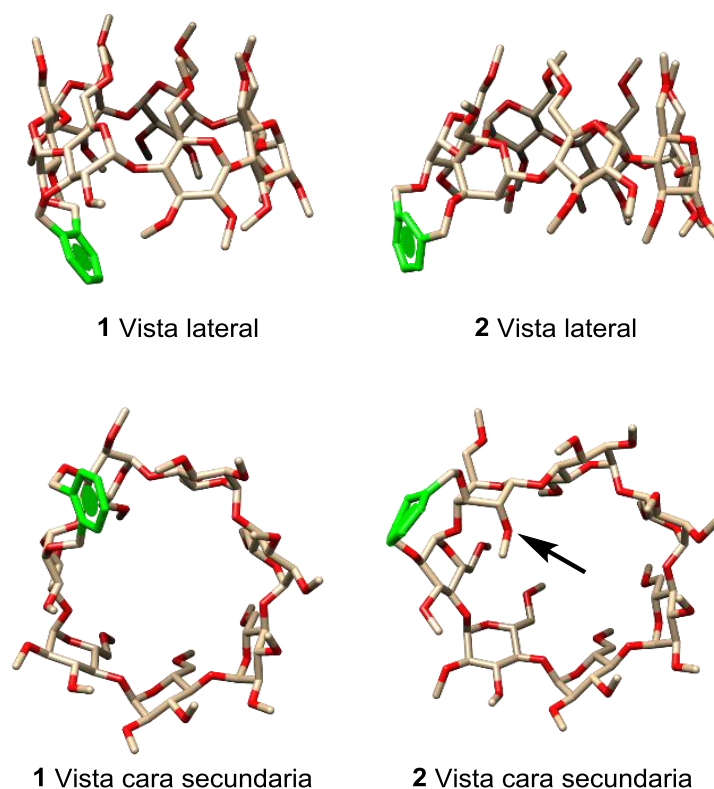
Ambos compuestos (**1** y **2**) presentan dos bandas de absorción en el espectro de dicroísmo circular inducido (ICD): una banda intensa a  $\approx 220$  nm y otra mucho más débil a  $\approx 260$ -265 nm. Mientras que la segunda banda permanece positiva en ambos derivados, la primera es positiva en el caso del derivado **1** y negativa para el derivado de *m*-xilileno **2** (Figura 3.10.). Estas diferencias, de acuerdo con los antecedentes,<sup>15</sup> son ilustrativas de una orientación distinta del anillo aromático respecto de la ciclodextrina. En el caso del derivado **1**, la dirección de los momentos de transición electrónica para el grupo xilileno respecto al eje de rotación de la  $\beta$ CD (A1 y B2), de acuerdo con las reglas del ICD,<sup>16</sup> indican que el anillo de *o*-xilileno se sitúa fuera de la cavidad de la CD, en una conformación semi-abierta: el momento de transición B2 se orienta perpendicularmente al eje principal del macroanillo y el de A1 se aleja ligeramente de la perpendicularidad. En el caso de **2**, los datos experimentales señalan una conformación completamente abierta con A1 y B2 casi paralelo y perpendicular, respectivamente, al eje principal de la ciclodextrina.



**Figura 3.10.** Espectros de dicroísmo circular inducido de **1** (A) y **2** (B) a diferentes concentraciones en agua.

*Estudios computacionales de Mecánica Molecular y Dinámica Molecular.*

Los cálculos llevados a cabo mediante MM y MD, en colaboración con el Prof. F. Mendicuti (Univ. Alcalá de Henares), son compatibles con los resultados experimentales obtenidos mediante ICD. La rigidez de los enlaces glicosídicos en las unidades de glucopiranosas conectadas por el segmento de xilileno evita que los derivados **1** y **2** adopten las conformaciones con tapadera, típicas de los derivados de CD con anillos de xilileno conectando dos posiciones de la misma glucosa.<sup>5a,6b</sup> Por otro lado, estos cálculos confirman que, mientras que el derivado **1** conserva la cavidad toroidal típica de la  $\beta$ CD, el clip de *m*-xilileno en **2** induce que la cavidad adopte forma ovoide (Figura 3.11.). Este hecho sólo se había observado previamente en solución en derivados de  $\beta$ CD con puentes anhidro.<sup>17</sup>



**Figura 3.11.** Representación 3D de las estructuras optimizadas (MM) de **1** (izquierda) y **2** (derecha). El anillo aromático se resalta en verde. La flecha negra en la estructura de **2** apunta al grupo O2<sup>II</sup>-Me en la unidad de glucopiranososa con conformación <sup>1</sup>C<sub>4</sub>, orientado hacia la entrada de la cavidad ovoide.

#### 3.2.4. Estudio de la capacidad de complejación.

Los cambios conformacionales que se produzcan en uno o varios de los monosacáridos que constituyen la estructura macrocíclica de la CD pueden perturbar las propiedades de inclusión.<sup>5a,6a,c</sup> La conformación semiabierta de **1** es, en principio, compatible con la inclusión de huéspedes hidrofóbicos con la

única limitación impuesta por el tamaño de la cavidad de la  $\beta$ CD. En cambio, en el caso de **2**, la orientación del sustituyente  $\text{O}2^{\text{H}}\text{-Me}$  hacia el interior (flecha negra en la Figura 3.11.) bloquea parcialmente la entrada de la cavidad. Cabe esperar, por tanto, que el grupo xileno, en función de su geometría, actúe como elemento de discriminación en la complejación de huéspedes hidrófobos, debido al cambio conformacional que induce en la cavidad y su acceso.

Para estudiar la diferencia en las propiedades de complejación de **1** y **2** se eligieron adamantano-1-carboxilato de sodio (**AC**) y 2-naftoato de metilo (**MN**) como ejemplos de huéspedes con forma esférica y plana, respectivamente. El estudio se llevó a cabo utilizando experimentos de valoración isoterma, monitorizados por RMN y UV, y cálculos computacionales.

#### 3.2.4.1. Estudios de complejación del adamantano-1-carboxilato sódico (**AC**).

La molécula de adamantano, con una geometría prácticamente esférica, presenta una alta afinidad por la cavidad de la  $\beta$ CD fruto de la excelente complementariedad de tamaño, forma y polaridad con su cavidad.

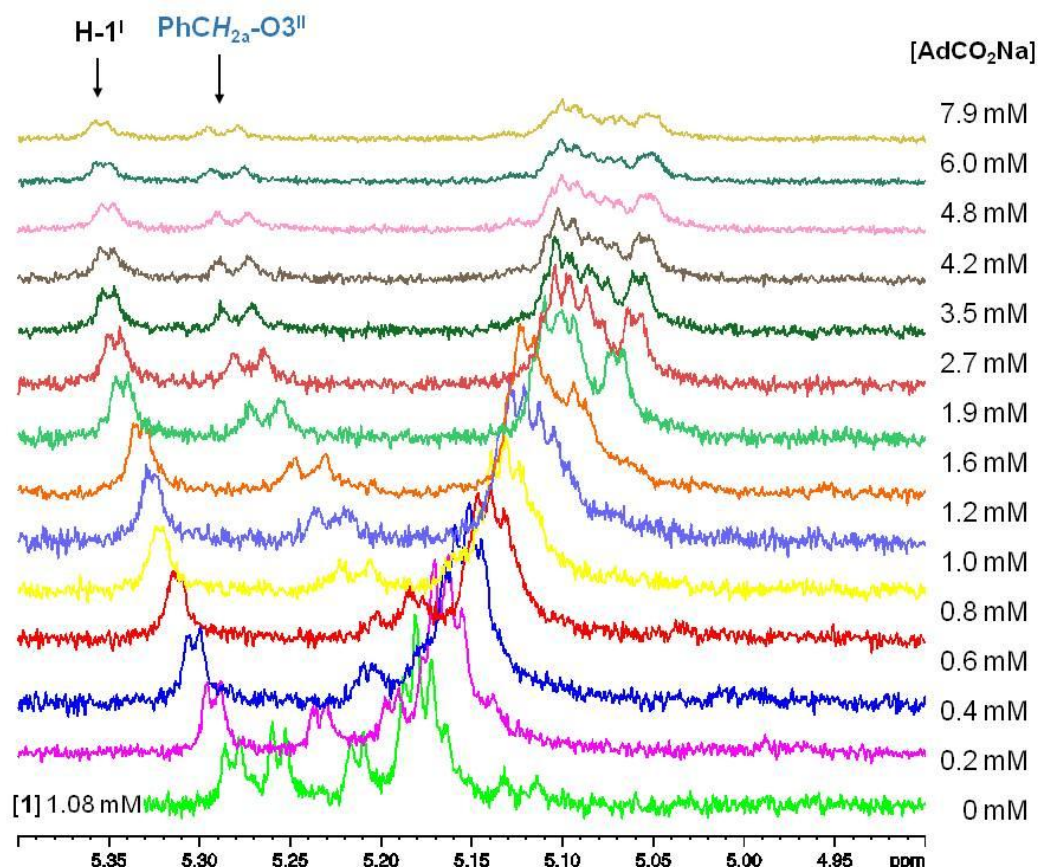
Los derivados de adamantano, como el adamantano-1-carboxilato, forman complejos de inclusión de estequiometría 1:1 con  $\beta$ CD con constantes de asociación superiores a  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , dos órdenes de magnitud superiores a las de la  $\alpha$ CD.<sup>18</sup> Incluso la  $\beta$ CD per-O-metilada (**58**), con una cavidad mucho más flexible, mantiene una capacidad de inclusión de **AC** relevante ( $K_{a(1:1)} = 606 \pm 43 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>19</sup> Con fines comparativos se obtuvo un valor de la constante  $K_a$  **58:AC** del mismo rango, aunque algo superior a la descrita ( $1262 \pm 130 \text{ M}^{-1}$ ).

La complejación del huésped **AC** se ha estudiado por RMN empleando disoluciones en el rango milimolar de los derivados **1** o **2** en medio acuoso de pH (o pD en el caso de  $\text{D}_2\text{O}$ ) y fuerza iónica controlada (tampón fosfato pH 7.4; 0.1

M), observando los desplazamiento de las señales de  $^1\text{H}$  RMN del receptor (**1** o **2**) a medida que se aumenta la concentración del huésped (**AC**). Para evitar que la concentración de receptor, pD o fuera iónica cambien a medida que se aumenta la del huésped, éste se prepara en una alícuota de la misma disolución del receptor.<sup>20</sup>

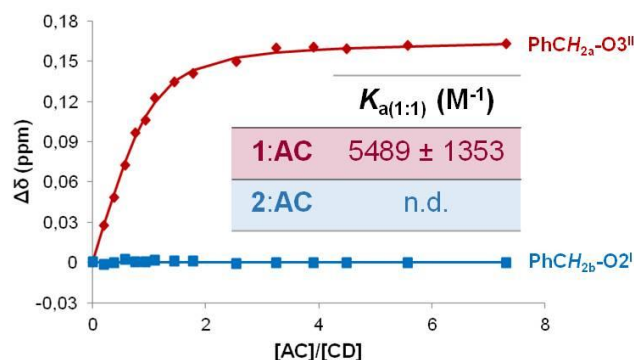
La Figura 3.12. muestra el espectro del derivado de *o*-xilileno **1** en ausencia del huésped y los espectros resultantes tras la adición sucesiva de alícuotas de la disolución de **AC**. Las adiciones se suceden hasta que no se producen cambios en el espectro del receptor, que indica la saturación de la complejación. El desplazamiento observado después de cada adición permite construir la isoterma de valoración, cuyo ajuste a través de un procedimiento de regresión de mínimos cuadrados a un modelo de estequiometría definida, permite determinar el valor de la constante de asociación ( $K_a$ ) entre **1** y **AC**. El ajuste iterativo de acuerdo con un modelo de estequiometría 1:1<sup>21</sup> para las isotermas construidas con cada uno de las señales de resonancia monitorizadas determinó un valor de  $K_a$  de  $5489 \pm 1353 \text{ M}^{-1}$ , superior al determinado por la misma técnica para el derivado permetilado **58** ( $1262 \pm 130 \text{ M}^{-1}$ ).





**Figura 3.12.** Región seleccionada del espectro de  $^1\text{H}$  RMN de **1** en ausencia (verde) y en presencia de cantidades crecientes de **AC**, con indicación del desplazamiento de las señales de  $\text{H-1}'$  y  $\text{CH}_{2a}\text{-O3}''$  inducidas por la adición del huésped.

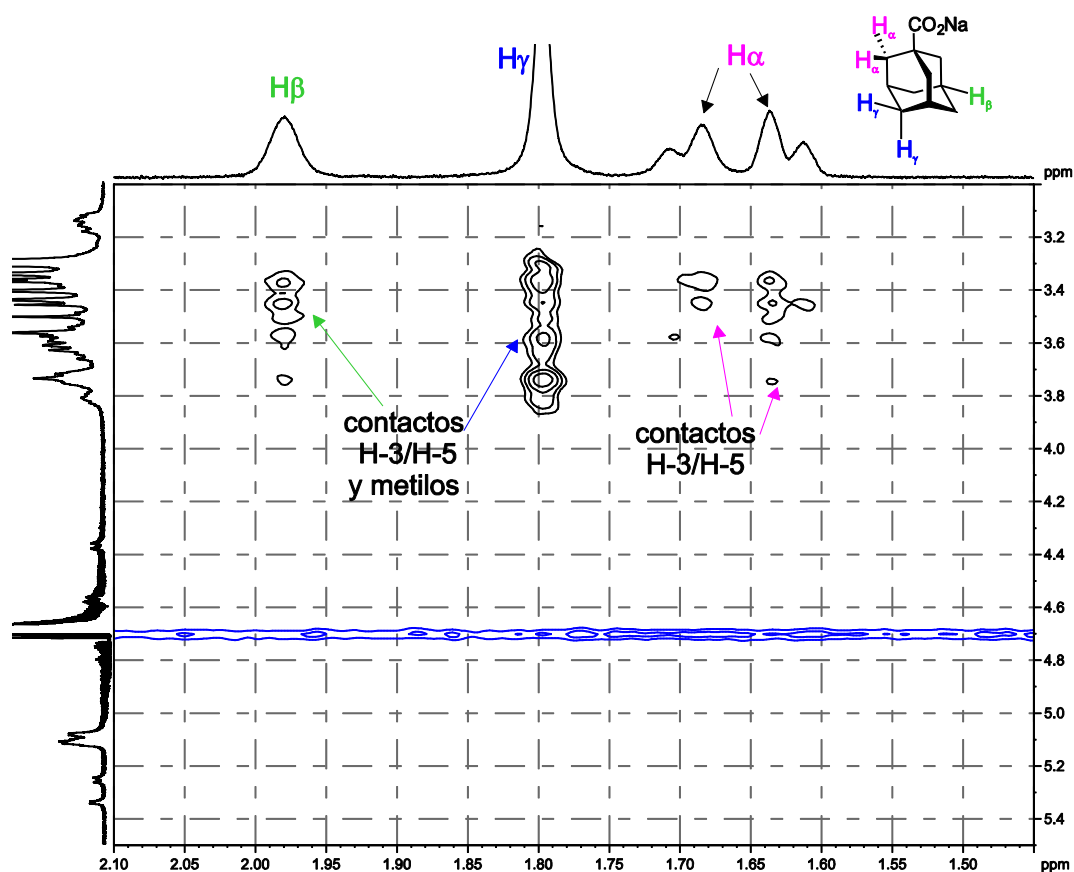
En el caso del derivado de *m*-xilileno **2** no se observaron desplazamientos de las señales de  $^1\text{H}$  RMN al incrementar la concentración de **AC** (Figura 3.13., línea azul), lo que se atribuye a que no hay formación de complejo o a que su  $K_a$  está por debajo del límite de detección de la técnica.



**Figura 3.13.** Isotermas de valoración obtenidas por  $^1\text{H}$  RMN de la complejación de **AC** con **1** (roja) y **2** (azul), indicando la constante de asociación resultante para el correspondiente complejo **1:AC** ( $K_{a(1:1)}$ ). No es posible determinar el valor de  $K_a$  del complejo **2:AC** al estar por debajo del límite de detección de la técnica.

Los espectros NOESY de una disolución **1:AC** en  $\text{D}_2\text{O}$  permitieron obtener información sobre la disposición del huésped en la cavidad de la CD. Se observan contactos entre los protones del interior de la cavidad (H-3 y H-5) y los del **AC** (H- $\alpha$ , H- $\beta$  y H- $\gamma$ ). La señales de corte de H- $\alpha$  y H- $\beta$  con los protones H-3 junto a los contactos NOE intensos existentes entre H- $\gamma$  y H-5 y, entre H- $\gamma$  y los protones de los grupos metilo de la cara secundaria indican que el huésped accede a la cavidad de la CD por su cara secundaria (Figura 3.14.).

Experimentos similares de mezclas equimoleculares de **2**: y **AC** no producen señales de corte intermolecular, descartando la inclusión del huésped en medio acuoso.

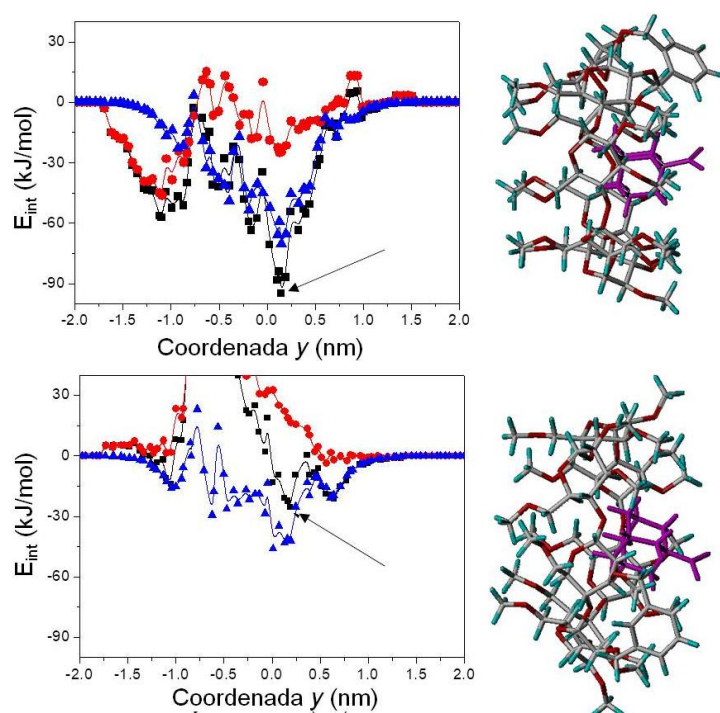


**Figura 3.14.** Espectro NOESY (500 MHz, D<sub>2</sub>O) de una mezcla equimolecular de **1** y **AC** (1 mM, pD 7.4, tampón fosfato 0.1 M).

*Estudios computacionales mediante Mecánica Molecular (MM) y Dinámica Molecular (MD).*

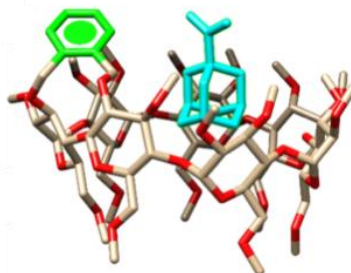
En colaboración con el Prof. F. Mendicuti se realizaron estudios computacionales. El cálculo de la energía de interacción ( $E_{\text{int}} = E_{\text{ele}} + E_{\text{vdw}}$ ) se llevó a cabo realizando una aproximación del huésped a la CD, situada en el origen del sistema de coordenadas, y determinando los parámetros geométricos

y los valores de energía que corresponden a cada aproximación. A partir de la representación de  $E_{\text{int}}$  frente a la distancia entre los centros de masa de huésped y receptor se determinó la posición más favorable que ocupa el huésped en la cavidad de la CD como la correspondiente con el mínimo en el perfil de energía de interacción (Figura 3.15.). Estos estudios indicaron que la energía de van der Waals ( $E_{\text{vdw}}$ ) y la energía electrostática ( $E_{\text{ele}}$ ) son las más afectadas durante la complejación.



**Figura 3.15.** Representación de la variación de la energía de interacción total (■) y las contribuciones electrostática (●) y de van der Waals (▲) en función de la distancia para la aproximación de **AC** a **1** (arriba) y a **2** (abajo). Las flechas indican las estructuras de mínima energía de interacción (MBE) utilizadas como conformaciones iniciales para las simulaciones de dinámica molecular.

En el caso de la interacción entre el derivado de *o*-xilileno **1** y **AC**, la aproximación alcanza una estructura de mínima energía de interacción (MBE) (Figura 3.16.) sin necesidad de superar ninguna barrera de energía de repulsión importante. Los cálculos están de acuerdo con los contactos NOE intermoleculares observados involucrando los protones H-5 y H-3 del derivado **1** (Figura 3.14.).



**Figura 3.16.** Representación 3D de la estructura optimizada (MM/MD) del complejo de inclusión **1:AC**.

En el caso de la complejación de **AC** con el derivado de *m*-xilileno **2**, el grupo metilo orientado hacia el interior de la cavidad ( $O2''$ -Me) bloquea la inclusión del huésped. De acuerdo con esta situación, los cálculos computacionales indican barreras potenciales importantes en las que las interacciones electrostáticas repulsivas muestran especial relevancia.

### 3.2.4.2. Estudios de complejación del 2-metilnaftoato (MN).

Los huéspedes aromáticos planos como el **MN** pueden adaptarse tanto a cavidades toroidales como ovoides.<sup>22</sup> El **MN** es una molécula pequeña e hidrófoba capaz de incluirse en la cavidad de la CD actuando como una sonda fluorescente sensible a la polaridad del medio por lo que ha sido objeto de numerosos estudios. En principio, el procedimiento es el mismo que con **AC**, pero la solubilidad del **MN** no permite hacer valoraciones por RMN u, sus propiedades fluorescentes, dependientes del pH, aconsejaban usar fluorescencia. En colaboración con el Prof. F. Mendicuti se ha llevado a cabo un estudio de la termodinámica de complejación de los derivados **1** y **2** con **MN**, empleando espectroscopía de fluorescencia y cálculos computacionales.

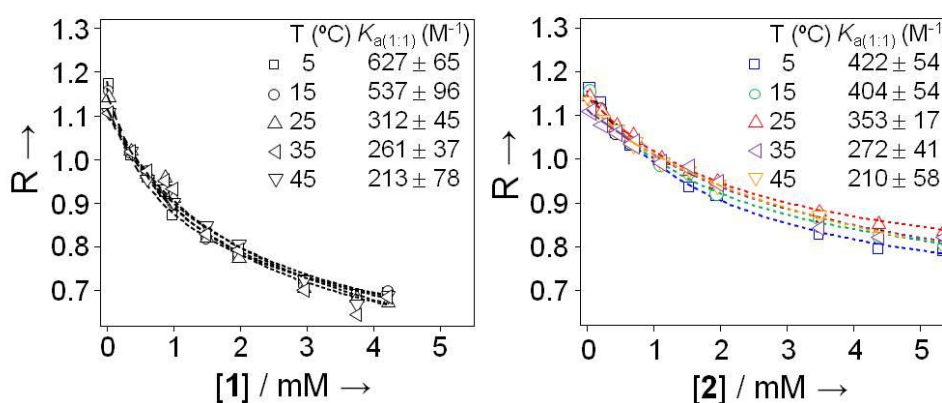
#### *Estudio mediante espectroscopía de fluorescencia.*

El estudio de complejación mediante medidas de fluorescencia tiene la ventaja de su elevada sensibilidad, que la hace especialmente indicada para la determinación de equilibrios con constantes  $K_a$  muy superiores a las que se pueden estudiar por RMN. La complejación de una especie fluorescente por una CD puede originar un desplazamiento de la  $\lambda$  de emisión o excitación, cambios en la intensidad de la fluorescencia, en el rendimiento cuántico o el tiempo de vida media de los estados excitados, entre otros parámetros.

Al producirse la inclusión en la cavidad de las CDs **1** y **2** tiene lugar un cambio en la polaridad del entorno del huésped (del medio acuoso en disolución a la cavidad hidrófoba de la CD) que se puede traducir en cambios en el espectro de emisión de fluorescencia. Estos cambios pueden utilizarse para estudiar el equilibrio termodinámico de complejación y determinar las constantes de equilibrio ( $K_a$ ) de los complejos del huésped **MN** con los derivados **1** y **2**. En el

caso de **MN**, la relación de intensidades de sus bandas de emisión a 385 y 365 nm ( $R = I_1/I_2$ ) está íntimamente asociada a la polaridad del entorno.<sup>6a,23</sup> Una disminución del valor de  $R$  con el aumento de la concentración de receptor supone una disminución en la polaridad del entorno del huésped **MN** y, por tanto, un aumento de la proporción de huésped complejoado.

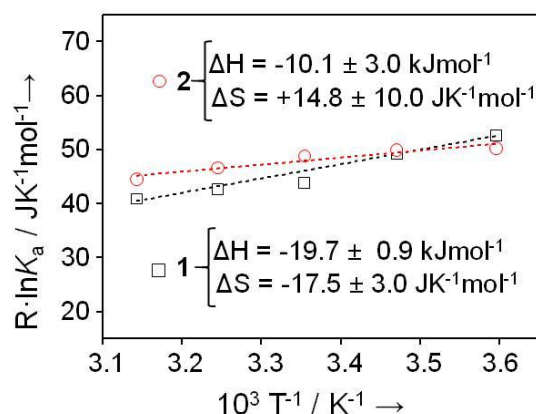
En la Figura 3.17. se muestran las isotermas de valoración para la formación del complejo de **MN** con los derivados **1** y **2** en disolución acuosa, obtenidas al representar  $R$  frente a la concentración del receptor (**1** o **2**). En todo el rango de temperaturas ensayadas, el aumento de la concentración de tanto de **1** como de **2** induce una disminución del valor de  $R$  proporcional a la fracción de huésped que pasa a estar complejoado. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo de estequiometría 1:1, con valores de  $K_a$  bastante similares.



**Figura 3. 17.** Isotermas de valoración de **1** (izquierda) y **2** (derecha) frente a MN a diferentes temperaturas, con indicación de los valores de la constante de asociación derivada ( $K_a$ ).

Aunque **1** y **2** muestran una afinidad similar por **MN** en agua, dando lugar a complejos de estequiometría 1:1 con constante en el rango 200-500  $M^{-1}$ , las

representaciones de Van't Hoff mostraron comportamientos termodinámicos significativamente diferentes. En el complejo **1:MN**, la fuerte contribución entálpica está parcialmente contrarrestada por un factor entrópico desfavorable. Por el contrario, en el caso de **2:MN**, la interacción entálpicamente más débil está sustentada por un término entrópico favorable (Figura 3.18.).



**Figura 3.18.** Representaciones lineales de Van't Hoff con indicación de las contribuciones entálpicas y entrópicas resultantes del proceso de complejación.

En principio, se esperaba que el movimiento rotacional del huésped de naftaleno se viera seriamente obstaculizado al pasar de la cavidad circular de **1** a la ovoide, más estrecha, de **2**, lo que conduciría a la tendencia opuesta en el término entrópico.<sup>24</sup> Los datos experimentales sugieren que la presencia del elemento aromático completamente abierto en **2** permite un modo de complejación alternativo que tolera más grados de libertad, probablemente al extender la cavidad.

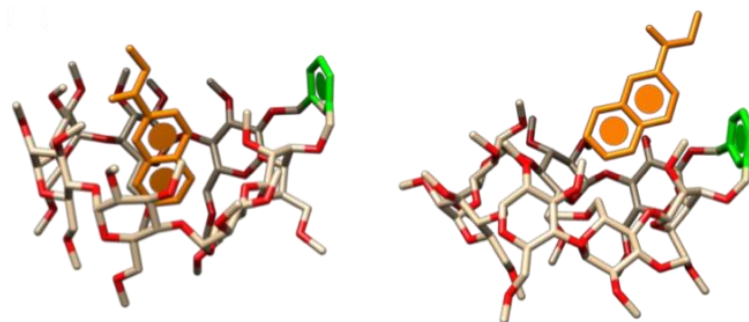
Los espectros <sup>1</sup>H RMN mostraron una dispersión considerable de las señales que corresponden al huésped en el caso del complejo **2:MN** que no se observaron en las del complejo **1:MN**. La existencia de un proceso de



intercambio químico relativamente lento en la escala de tiempo de RMN podría explicar esta observación.

*Cálculos computacionales mediante Mecánica y Dinámica Molecular.*

Los cálculos de MM y MD confirmaron este escenario, compatible con un intercambio de moléculas de **MN** entre la cavidad ovoide de **2** y un sitio más expuesto y más polar situado a la entrada de la cara secundaria, parcialmente protegido por el clip de xilileno y los grupos OMe de la cara secundaria (Figura 3.19.). También mostraron que la inclusión del huésped **MN** a través de la cara secundaria presenta barreras energéticas inferiores a las de la inclusión a través de la cara primaria.

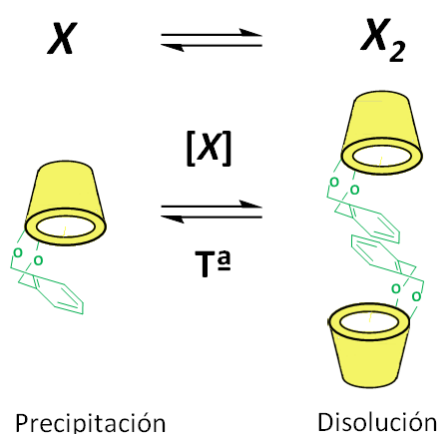


**Figura 3.19.** Representación 3D de las dos estructuras límite optimizadas por MM/MD del complejo **2:MN**.

### 3.2.5. Estudio de las propiedades de autoasociación.

Los derivados de CD funcionalizados con segmentos de *o*- (**1**) y *m*-xilileno (**2**) resultaron solubles en agua a 25 °C a concentraciones de 5 mM y 20 mM respectivamente. Sin embargo, al calentar por encima de 30 °C (**1**) y 50 °C

(2) estas disoluciones se vuelven turbias. Ambos compuestos precipitan, redisolviéndose al enfriar. Este fenómeno se ha descrito con anterioridad en derivados de CD metilados con un sustituyente aromático doblemente enlazado en la cara secundaria (e. g. **57**).<sup>5a,6b</sup> Y se atribuyó a la tendencia a formar dímeros supramoleculares enfrentando sus segmentos aromáticos de forma que estos queden protegidos del medio acuoso.<sup>25</sup> La solubilidad del dímero es, en estos casos, superior a la del monómero, lo cual explica la tendencia a precipitar a temperaturas más altas por el desplazamiento del equilibrio hacia la especie monómera (Figura 3.20.).



**Figura 3.20.** Esquema de equilibrio de dimerización en CDs.

La mayor susceptibilidad del derivado *o*-xililenado **1** en comparación con el *m*-xililenado **2** para precipitar a partir de soluciones acuosas durante el calentamiento puede interpretarse en términos de diferencias para auto-ensamblarse en forma de dímeros supramoleculares.

En colaboración con C. Przybylski (Sorbonne Université, París, Francia) se analizó la capacidad de dimerización de los derivados xililenados empleando

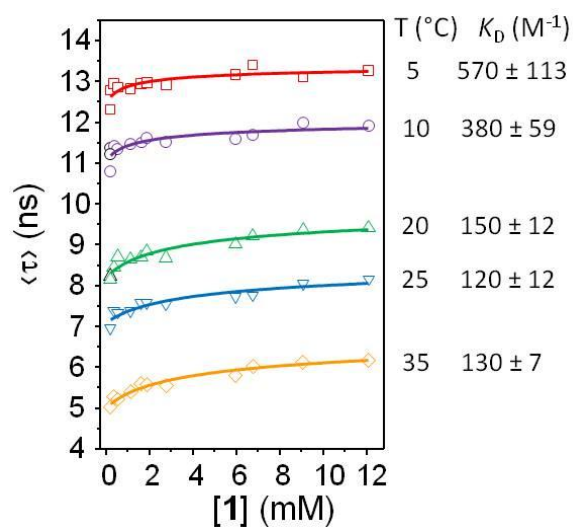
espectrometría de masas de alta resolución mediante ionización por electrospray (ESI-HRMS) y MALDI-TOF. En la Figura 3.21. se muestra el espectro de masas MALDI-TOF de **1** en el que se destacan los picos atribuibles a los iones pseudomoleculares  $[1\text{-dímero} + \text{H}]^+$  y  $[1\text{-dímero} + \text{Na}]^+$ .



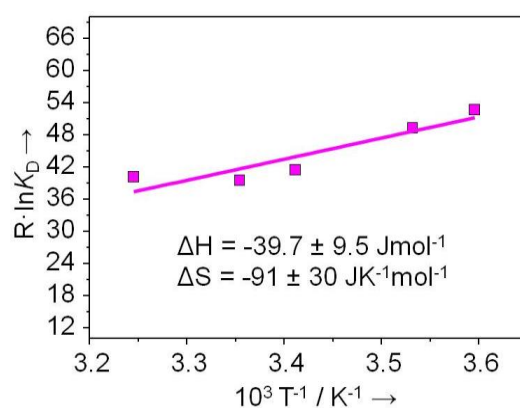
**Figura 3.21.** Espectro de masas MALDI-TOF (modo de detección positivo) del compuesto **1**.

*Determinación de la constante de dimerización ( $K_D$ ) y parámetros termodinámicos.*

Las constantes de dimerización de **1** y **2** se han estimado a partir de la velocidad de decaimiento de fluorescencia. Este parámetro variación en función de la concentración de las especies en disolución y su análisis resulta útil en el estudio de equilibrios en los que se interconvierten varias especies. A cualquiera de las temperaturas investigadas, las isothermas de valoración de **1** (Figura 3.22.) se pueden ajustar a un modelo de equilibrio entre dos especies, monómero y dímero.



**Figura 3.22.** Gráficos de las variaciones de vida media de fluorescencia ponderada ( $\langle \tau \rangle$ ) de **1** a concentraciones crecientes y diferentes temperaturas, con indicación de los valores de la constante de dimerización derivada ( $K_D$ ).



**Figura 3.23.** Representación lineal de Van't Hoff con indicación de la contribuciones entálpicas y entrópicas resultantes del proceso de dimerización de **1**.

A la concentración más alta utilizada en los experimentos de fluorescencia (12 mM) y 25 °C, aproximadamente el 30% de **1** está en forma

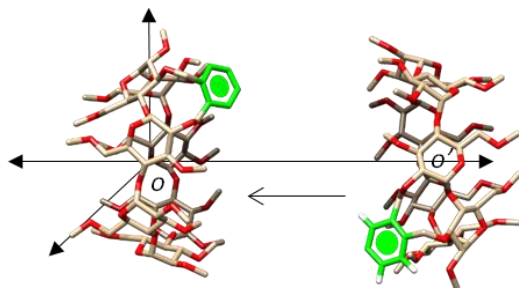
dímera, lo que es similar a lo publicado previamente para el isómero posicional **57**.<sup>5a,6b</sup> No obstante, los correspondientes valores de  $\Delta H$  ( $-39,7 \pm 9,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y  $\Delta S$  ( $91 \pm 30 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) calculados a partir de la representación de Van't Hoff (Figura 3.23.) difieren significativamente de los descritos para **57** ( $-22,7 \pm 4,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $-34 \pm 15 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectivamente).

El término entrópico desfavorable implica que la pérdida de los grados de rotación y de traslación durante la dimerización de **1** no se compensa por la liberación de las moléculas de agua de solvatación del segmento aromático en el monómero. Esto probablemente es consecuencia de una pobre solvatación y una baja movilidad en la región de la molécula del *o*-xilileno, lo que está de acuerdo con la tendencia observada de **1** a precipitar a partir de soluciones acuosas cuando el equilibrio se desplaza desde el dímero al monómero mediante calentamiento (hay que tener en cuenta que la dimerización es un proceso exotérmico). Sin embargo, el decaimiento de la intensidad de fluorescencia para el derivado de *m*-xilileno **2** se ajustó razonablemente a una única exponencial a cualquier temperatura, lo que sugiere que sólo la forma monómera está presente en solución acuosa.

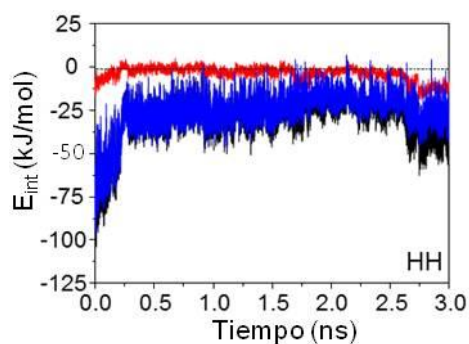
#### *Estudios de dimerización mediante Mecánica y Dinámica Molecular.*

Para obtener una visión más completa de las características moleculares que sustentan las diferencias en las propiedades de dimerización de **1** y **2**, se llevó a cabo un estudio del proceso de dimerización mediante dinámica molecular. Para ello, se dispuso una molécula del correspondiente derivado CD en su conformación optimizada según lo determinado por MM/MD, con el centro de masas (indicado como *o*) en el origen de un sistema de coordenadas. A continuación se aproximó una segunda molécula (centro de masas *o'*) paso a paso a lo largo del eje *y* (Figura 3.24.). Se optimizaron las estructuras de los

dímeros de mínima energía de enlace (MBE) (MM, gradiente  $0.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$ ) y se usaron como conformaciones iniciales para realizar simulaciones de dinámica molecular de 2 ns.



**Figura 3.24.** Sistema de coordenadas utilizado para emular el proceso de dimerización de **1** (a través de sus caras secundarias) por MM.



**Figura 3.25.** Historia de las energías de interacción total (negro) y contribuciones electrostáticas (rojo) y de Van der Waals (azul) en el proceso de dimerización de **1**.

Como se observa en la Figura 3.25., las interacciones de van der Waals representan la contribución más importante a la energía de interacción total, al localizarse los segmentos de xilileno en el espacio entre las caras secundarias de las CDs sin llegar a incluirse en el interior. En el caso de **2**, la dimerización se ve desfavorecida debido a la disposición abierta del segmento de *m*-xilileno tras la inversión de la conformación de la silla en la unidad de glucosa II distorsionando de la cavidad.

### 3.3. Conclusiones.

El conjunto de resultados presentados demuestra que las propiedades conformacionales y supramoleculares de la  $\beta$ CD pueden modularse mediante la incorporación en su cara secundaria de un grupo xilileno unido simultáneamente a dos unidades de glucosa consecutivas. A partir de un precursor común, el diol **59**, la incorporación de un grupo *o*- o *m*-xilileno, isoméricos pero con sutiles diferencias geométricas, modifica la conformación de la CD que pasa de adoptar una cavidad toroidal adecuada para incluir huéspedes globulares a una ovoide que acepta exclusivamente ligandos planos. Este cambio se debe a la distorsión de la conformación convencional de la silla  ${}^4C_1$  de la unidad de D-glucopiranosido II a  ${}^1C_4$  inducida por el clip de *m*-xilileno. A diferencia del isómero de *o*-xilileno (**1**), en **2** el anillo aromático pasa de orientarse en disposición semi-abierta a completamente abierta. Es interesante destacar que la incorporación de *o*-xilileno promueve la formación de dímeros supramoleculares enfrentando las caras secundarias mientras que la incorporación de *m*-xilileno promueve especies monómeras en medios acuosos.

La metodología sintética, basada en la reducción regioselectiva de dos grupos de éter metílico en la cara secundaria de las ciclodextrinas utilizando DIBAL-H, permite obtener el compuesto tetradesmetilado **60**. A partir de este se comprobó que la estrategia es compatible con la incorporación de dos clips aromáticos como elementos de control conformacional.

Estos resultados han sido publicados en el artículo titulado “Xylylene Clips for the Topology-Guided Control of the Inclusion and Self-Assembling Properties of Cyclodextrins” en la revista *Journal of Organic Chemistry (J. Org. Chem.* **2018**, 83, 5588-5597).

- <sup>1</sup> a) T. Matsuno, S. Kamata, S. Sato, A. Yokoyama, P. Sarkar, H. Isobe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15020-15024; b) Y. Zhon, Y. Yan, Y. Shen, W. Xu, Q. Wang, A. L. Connor, X. Zhou, L. He, X. C. Zeng, Z. Shao, Z. Lu, B. Gong, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15950-15957; c) T. Zhang, L.-P. Zhou, X.-Q. Guo, L.-X. Cai, Q.-F. Sun, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15898; d) S. T. J. Ryan, J. del Barrio, R. Suardíaz, D. F. Ryan, E. Rosta, O. A. Scherman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 16096-16100; e) M. Yoshizawa, J. K. Klosterman, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1885-1898.
- <sup>2</sup> M. R. Gamielien, I. Maestre, C. Jaime, K. J. Naidoo, *ChemPhysChem*, **2010**, *11*, 452-459.
- <sup>3</sup> Y. Liu, Y. Chen, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 681-691.
- <sup>4</sup> T. Neva, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *J. Carbohyd. Chem*, **2019**, doi: 10.1080/07328303.2019.1609020.
- <sup>5</sup> a) P. Balbuena, D. Lesur, M. J. González Álvarez, F. Mendicuti, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2007**, 3270-3272; b) P. Balbuena, R. Gonçalves-Pereira, J. L. Jiménez Blanco, M. I. García-Moreno, D. Lesur, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1390-1403.
- <sup>6</sup> a) M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, L. Gallego-Yerga, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2961-2972; b) M. J. González-Álvarez, P. Balbuena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717-13729; c) N. Mayordomo, M. J. González-Álvarez, L. Gallego-Yerga, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Photochem. Photobiol. A* **2013**, *256*, 42-51; d) M. J. González-Álvarez, J. Vicente, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975-988.
- <sup>7</sup> L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6622-6627.
- <sup>8</sup> a) S. Xiao, M. Yang, P. Sinaÿ, Y. Blériot, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1510-1516; b) B. Roizel, J. P. Baltaze, P. Sinaÿ, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2371-2373.
- <sup>9</sup> a) A. J. Pearce, P. Sinaÿ, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610-3612.
- <sup>10</sup> a) T. Lecourt, A. Herault, A. J. Pearce, M. Sollogoub, P. Sinaÿ, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2960-2971; b) B. Wang, E. Zaborova, S. Guieu, M. Petrillo, M. Guitet, Y. Blériot, M. Ménand, Y. Zhang, M. Sollogoub, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5354-5360; c) P. Zhang, J. Meijide Suárez, T. Driant, E. Derat, Y. Zhang, M. Ménand, S. Roland, M. Sollogoub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10821-10825; d) P. Zhang, C. Tugny, J. Meijide Suárez, M. Guitet, E. Derat, N. Vanthuyne, Y. Zhang, O. Bistri, V. Mouriès-Mansuy, M. Ménand, S. Roland, L. Fensterbank, M. Sollogoub, *Chem* **2017**, *3*, 174-191; e) B. Wang, M. Bols, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 13766-13775; f) M. Ménand, M. Sollogoub, B. Boitrel, S. Le Gac,



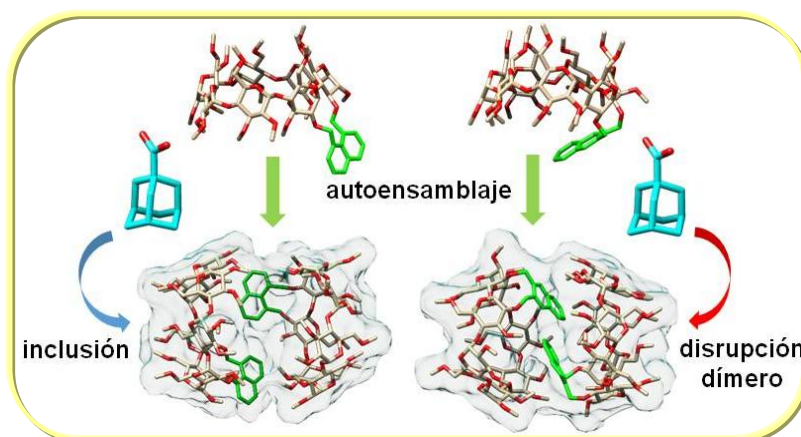
- Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 297-301; g) S. Le Gac, B. Boitrel, M. Sollogoub, M. Ménand, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9347-9350; h) M. Sollogoub, *Synlett* **2013**, 2629-2640.
- <sup>11</sup> a) J. Yang, Y. Wang, A. Rassat, Y. Zhang, P. Sinaÿ, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 12163-12168; b) S. Xiao, Q. Wang, F. Yu, Y. Peng, M. Yang, M. Sollogoub, P. Sinaÿ, Y. Zhang, L. Zhang, D. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5616-5622; c) X. Zhu, A. Quaranta, R. V. Bensasson, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9462-9466; d) Y. Zhou, E. Lindbäck, C. M. Pedersen, M. Bols, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2304-2307; e) Y. Zhou, C. M. Pedersen, M. Bols, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2458-2461; f) Y. Zhou, E. Lindbäck, L. G. Marinescu, C. M. Pedersen, M. Bols, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4063-4070.
- <sup>12</sup> J. Sjeztli, A. Lipták, I. Jodál, P. Fügedi, P. Nánasi, A. Neszmélkyi, *Starch* **1980**, *32*, 165-169.
- <sup>13</sup> a) M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15; b) M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
- <sup>14</sup> J. A. Faiz, N. Spencer, Z. Pikramenou, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4239-4245.
- <sup>15</sup> H. Shimizu, A. Kaito, M. Hatano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 513-519.
- <sup>16</sup> a) M. Kodaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3702-3705; b) M. Kodaka, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, *93*, 2057-2059; c) M. Kodaka, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 8101-8103.
- <sup>17</sup> a) K. Fujita, H. Yamamura, T. Imoto, I. Tabushi, *Chem. Lett.* **1988**, *17*, 543-546; b) S. Immel, K. Fujita, M. Fukudome, M. Bolte, *Carbohydr. Res.* **2001**, *336*, 297-308; c) M. Fukudome, K. Shimosaki, K. Koga, D.-Q. Yuan, K. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 7493-7497; d) M. Fukudome, K. Yoshikawa, K. Koga, D.-Q. Yuan, K. Fujita, *Chem. Commun.* **2007**, 3157-3159; e) D. Álvarez-Dorta, E. I. León, A. R. Kennedy, A. Martín, I. Pérez-Martín, E. Suárez, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3674-3678; f) D. Álvarez-Dorta, E. I. León, A. R. Kennedy, A. Martín, I. Pérez-Martín, E. Suárez, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 11766-11787.
- <sup>18</sup> M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1918.
- <sup>19</sup> G. Wenz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1890-1895.
- <sup>20</sup> a) A. P. Bisson, C. A. Hunter, J. C. Morales, K. Young, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 845-851; b) A. P. Bisson, F. J. Carver, D. S. Eggleston, R. C. Haltiwanger, C. A. Hunter, D. L. Livingstone, J. F. McCabe, C. Rotger, A. E. Rowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8856-8868.
- <sup>21</sup> a) <http://supramolecular.org/>; b) D. B. Hibbert, P. Thordarson, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12792-12805; c) P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.
- <sup>22</sup> P. Lo Meo, F. D'Anna, S. Riela, M. Gruttadauria, R. Noto, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *71*, 121-127.

- 
- <sup>23</sup> a) A. Di Marino, F. Mendicuti, *Appl. Spectrosc.* **2002**, 56, 1579-1587; b) J. M. Madrid, F. Mendicuti, *Appl. Spectrosc.* **1997**, 51, 1621-1627; c) J. M. Madrid, F. Mendicuti, W. L. Mattice, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 2037-2044; d) M. Cervero, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 1572-1580; e) I. Pastor, A. Di Marino, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 1995-2003; f) I. Pastor, A. Di Marino, F. Mendicuti, *J. Photochem. Photobiol. A* **2005**, 173, 238-247; g) C. Alvariza, R. Usero, F. Mendicuti, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2007**, 67A, 420-429; h) R. Usero, C. Alvariza, M. J. González-Álvarez, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2008**, 18, 1103-1114.
- <sup>24</sup> K. Yoshikiyo, Y. Matsui, T. Yamamoto, Y. Okabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, 80, 1124-1128.
- <sup>25</sup> S. Filippone, F. Heimann, A. Rassat, *Chem. Commun.* **2002**, 1508-1509.

# Capítulo 4

## Ciclodextrinas con sustituyentes de naftaleno tipo clip: modulación de las propiedades de autoasociación y control de cavidades supramoleculares.

La incorporación a la  $\beta$ CD de clips de naftaleno doblemente unidos mediante las posiciones O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup> promueve su autoensamblaje en dímeros que enfrentan sus segmentos aromáticos y actúan como paredes que extienden la cavidad o como pantallas plegables que separan las dos unidades de  $\beta$ CD. En un segundo nivel de organización supramolecular, la estructura dimérica dirige las interacciones *host-guest*: en función de la geometría del segmento aromático, la inclusión del AC puede ser compatible con la estructura de dímero o provocar su disociación. Se consigue así controlar y programar la capacidad de autoorganización y de respuesta a estímulos externos de derivados diastereoméricos de CD.



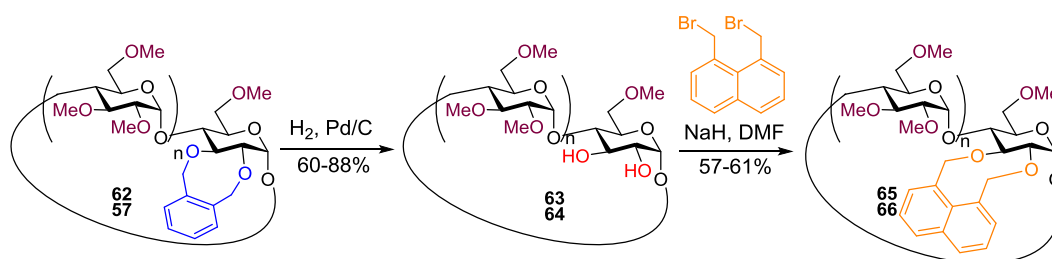
T. Neva, T. Carmona, J. M. Benito, C. Przybylski, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Front. Chem.* **2019**, 7,72.



#### 4. Ciclodextrinas con sustituyentes de naftaleno tipo clip: modulación de las propiedades de autoasociación y control de cavidades supramoleculares.

##### 4.1. Antecedentes bibliográficos.

La incorporación a la estructura de la CD del grupo cromóforo naftaleno ha sido investigada por sus aplicaciones como dispositivos moleculares fotoquímicos y como sensores moleculares. Siendo un factor determinante la posición de este, la mayoría de ejemplos lo unen a la CD en una única posición.<sup>1</sup> En trabajos anteriores del grupo se han preparado derivados de CD que incorporan un anillo de 1,8-dimetilnaftileno uniendo las posiciones secundarias O-2 y O-3 de una unidad de glucosa (**65**, **66**) (Esquema 4.1.).<sup>2</sup>



**Esquema 4.1.** Síntesis de los derivados de  $\alpha$ - y  $\beta$ CDs (**65** y **66**, respectivamente) con anillo de 1,8-dimetilnaftileno uniendo las posiciones O-2<sup>l</sup> y O-3<sup>l</sup>.

La ruta sintética parte de los derivados  $\alpha$  y  $\beta$  con anillo *o*-xilileno, **62** y **57**, respectivamente, y requiere la hidrogenación catalítica ( $\rightarrow$  **63**, **64**) seguida de la re-alkilación de los hidroxilos liberados con 1,8-bis(bromometil)naftaleno ( $\rightarrow$  **65**, **66**), ya que la alquilación directa de  $\alpha$ - y  $\beta$ CD comerciales con este último no es regioselectiva.

El tamaño de la plataforma oligosacáridica afecta a la capacidad de autoasociación de estos compuestos en agua, sin embargo, todos ellos mostraron una  $K_D$  mayor que sus análogos xililenados (Tabla 4.1.). Sus dímeros resultan estables y no se disocian en presencia **AC**.<sup>3</sup>

**Tabla 4.1.** Constantes de dimerización ( $K_D$ ) en agua de las CDs con grupos *o*-xilileno y 1,8-dimetilnaftileno uniendo las posiciones O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>I</sup>.

Compuesto	62	65	57	66
$K_D$ (M <sup>-1</sup> )	177	$8 \cdot 10^5$	200	$9.2 \cdot 10^4$

El drástico cambio en las propiedades supramoleculares de las CDs en función del tipo de unión y del elemento de restricción conformacional incorporado analizado en el Capítulo 3 de esta Tesis incitan a estudiar la flexibilidad de la estrategia sintética modificando la naturaleza del clip aromático.

En base a estos antecedentes, se evalúa la flexibilidad del esquema sintético para modular diferentes modos de autoensamblaje y complejación incorporando módulos de naftaleno con diferentes orientaciones respecto a la CD.

## 4.2. Resultados y discusión.

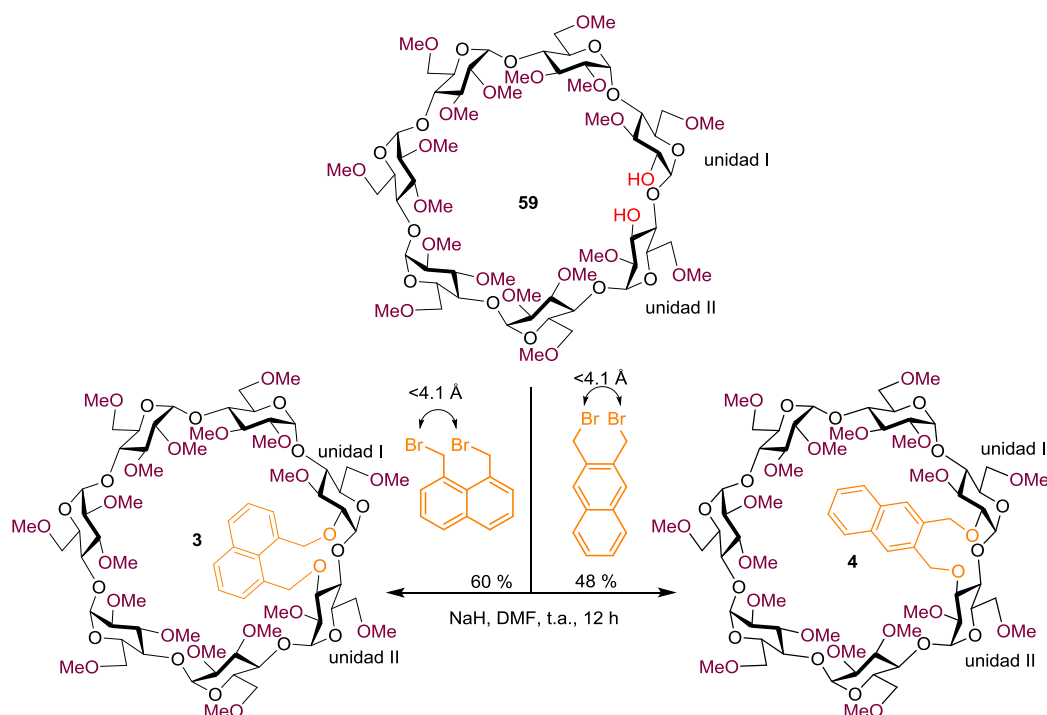
### 4.2.1. Síntesis de ciclodextrinas con sustituyentes de naftileno tipo clip.

La eficacia de la reacción del derivado *o*- y *m*-xilileno del diol **59** induce a pensar que la reacción puede funcionar igualmente bien para la instalación de otros segmentos aromáticos. Para investigar esta posibilidad, nos hemos fijado en 1,8- y 2,3-dibromometilnaftaleno (Esquema 4.2.), dos derivados isoméricos de

naftaleno con geometría radicalmente distinta. El primero de ellos es comercial. El segundo se puede obtener a partir de 2,3-dimetilnaftaleno en un solo paso por tratamiento con  $\text{Br}_2$  y AIBN.<sup>4</sup>

La distancia entre las posiciones O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup> en el diol **59**, de 3.4 Å (Esquema 4.2.), permite en principio acomodar segmentos de 1,8- y 2,3-dimetilnaftileno ya que la distancia de separación de sus posiciones bencílicas, como en el *o*-xilileno, es menor a 4.1 Å. La incorporación de los grupos naftaleno en principio, no debe provocar tensión significativa que fuerce cambios en la estructura primaria de las CDs. De modo, es de esperar que cualquier cambio en sus propiedades supramoleculares pueda atribuirse a la presencia y orientación del grupo aromático.

De forma similar a la descrita para la síntesis de los compuestos **1** y **2**, los compuestos **3** y **4** se prepararon a partir del diol **59**<sup>5</sup> mediante alquilación con 1,8- y 2,3-bis(bromometil)naftaleno promovida por hidruro sódico en DMF y con rendimientos del 60 y 48%, respectivamente (Esquema 4.2.).

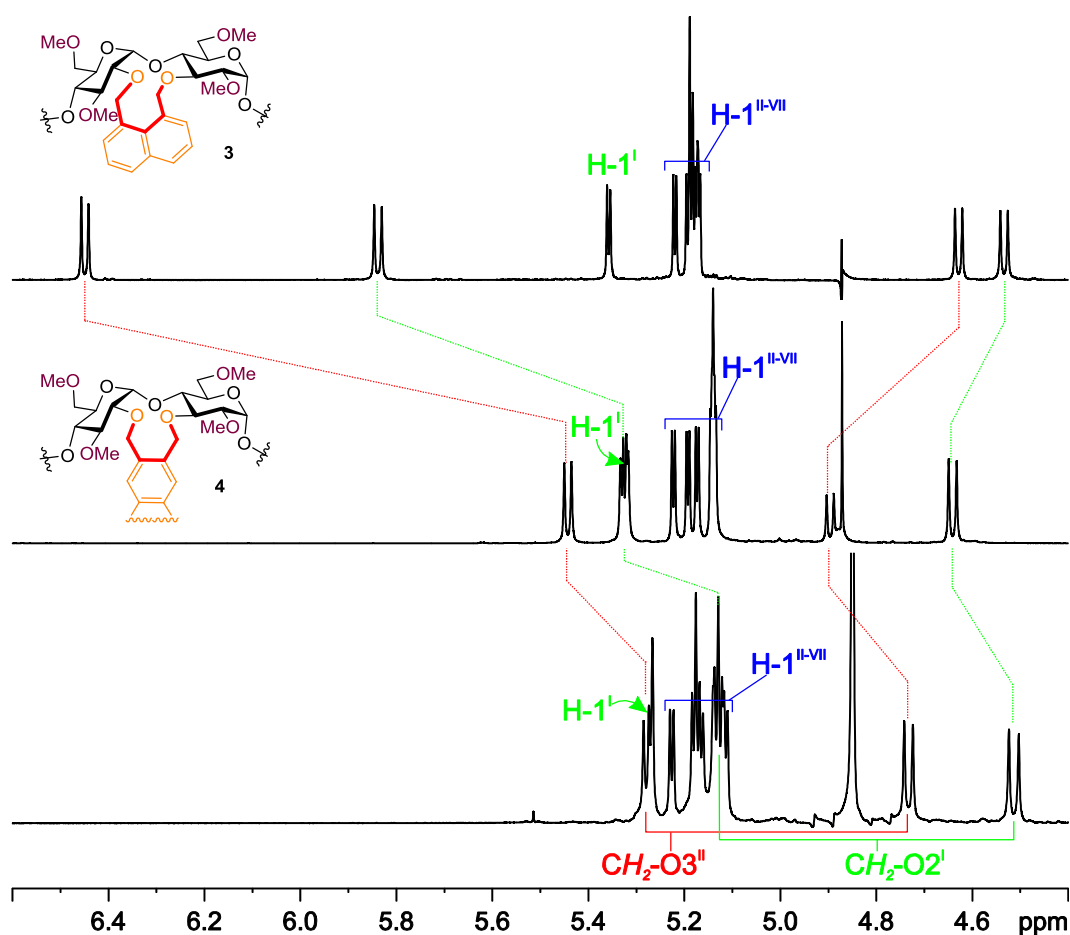


**Esquema 4.2.** Síntesis de los derivados de  $\beta$ CD funcionalizados con segmentos de 1,8- y 2,3-dimetilnaftaleno **3** y **4**, respectivamente.

El espectro de masas del crudo de reacción muestra la formación de un único producto (**3** o **4**), sin que se detecten trazas de productos de alquilación parcial o sobrealquilación. Los experimentos de espectroscopía de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN de los compuestos **3** y **4**, registrados a 600 MHz en MeOD, confirmaron la doble unión de los grupos naftílenos a dos unidades consecutivas de glucosa en el producto obtenido. Todas las unidades de glucopiranososa mantienen la conformación de silla  $^4\text{C}_1$ , conservando la estructura troncocónica toroidal de las CDs. Los experimentos 1D TOCSY muestran constantes de acoplamiento vecinales  $^3J_{\text{H,H}}$  en el rango de 9-10 Hz, característico de la disposición relativa diaxial entre los protones H-2, H-3, H-4 y H-5 de cada una de las unidades de glucosa de **3** y **4**.



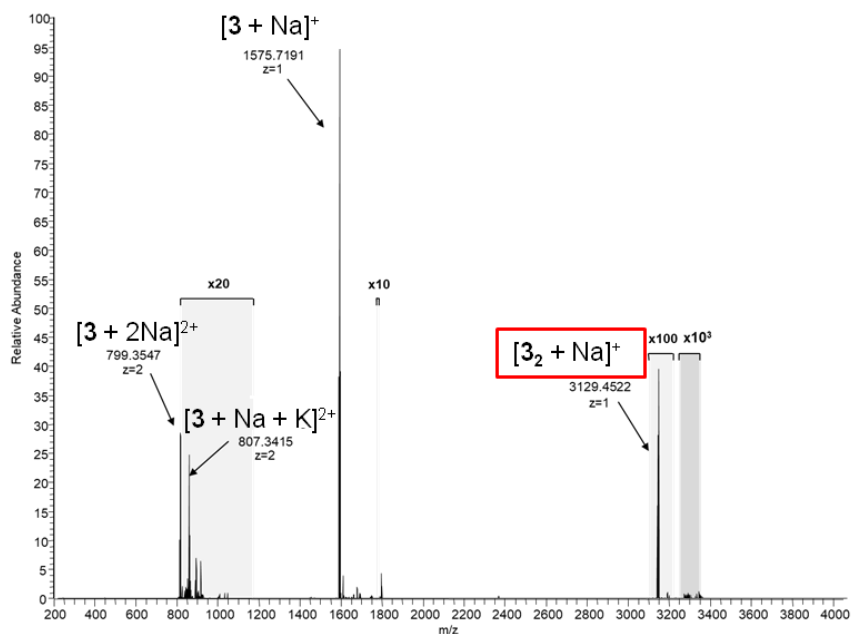
En el caso del compuesto **3**, el segmento de 1,8-di-O-metilnaftileno impone a la estructura de la CD una región aplanada de cinco carbonos que impone una rigidez considerable y provoca una amplia dispersión de las resonancias de los protones bencílicos (Figura 4.1., arriba). En el compuesto **4**, el segmento aplanado se reduce a cuatro carbonos, que debe permitir una mayor flexibilidad. De hecho, su espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 4.1., centro) se parece mucho al espectro del derivado **1** (Figura 4.1., abajo).



**Figura 4.1.** Región anomérica y bencílica de los espectros  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz, MeOD) de **3** (arriba), **4** (centro) y **1** (abajo).

#### 4.2.2. Estudio de las propiedades de autoasociación.

La solubilidad de **3** y **4** en  $\text{H}_2\text{O}$  es considerablemente inferior a la de **1**. Los derivados **3** y **4** mostraron un comportamiento diferente en solución acuosa. El derivado funcionalizado con el segmento 2,3-naftileno (**4**) mostró un coeficiente de solubilidad negativo en agua más destacado que **3**. La disolución clara a 25 °C, cuando se calienta, se enturbia inmediatamente, volviendo al estado límpido original al enfriarse.<sup>67</sup> Sin embargo, los grupos naftílenos promueven interacciones intermoleculares más fuertes que el grupo xilileno,<sup>3a,8,9</sup> lo que hace improbable que **3** exista preferentemente en forma monomérica en solución acuosa concentrada. De hecho, los espectros de masas ESI de alta resolución de soluciones acuosas de **3** (Figura 4.2.) y **4** mostraron picos pseudomoleculares correspondientes a las especies dímeras proporcionalmente mucho más intensas que las de **1** (Figura 3.21.).



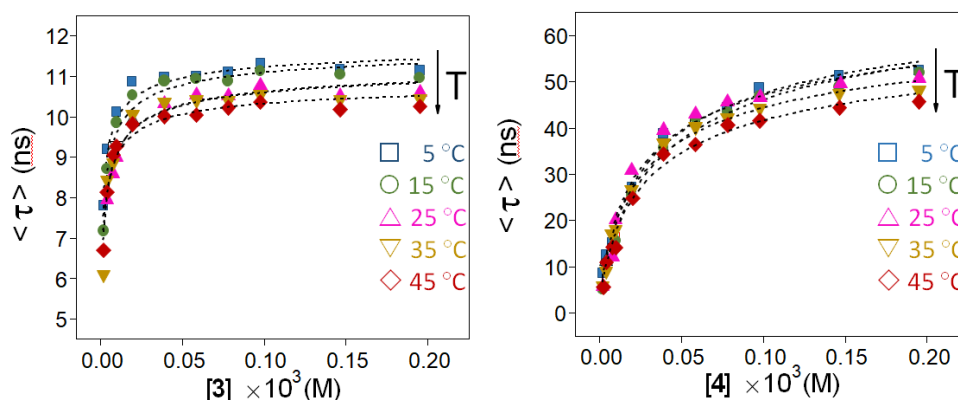
**Figura 4.2.** Espectro HR-ESI-MS del compuesto **3**. Se resalta la fracción del dímero en el recuadro rojo.

Los datos experimentales indican que la superficie aromática de **3** se expone de manera similar al disolvente tanto en la forma monómera como en la dímera, por lo que el desplazamiento del equilibrio por calentamiento o enfriamiento no debe tener un impacto significativo en su solubilidad en agua, que en cualquier caso, es baja. En el dímero de **4** las paredes de naftaleno se pueden situar entre las dos CDs, como lo observado en los dímeros de **57** o **1**, mientras que en el dímero de **3** los grupos naftileno permanecen en contacto con el agua, posiblemente actuando como módulos de extensión de la cavidad de la CD.

Mediante espectroscopía de fluorescencia se realizó un estudio detallado de la capacidad de autoasociación de ambos compuestos en colaboración con el grupo del Prof. F. Mendicuti. El análisis de los perfiles de decaimiento de

fluorescencia resuelta en tiempo confirmó la tendencia de **3** y **4** de dimerizar en solución acuosa. Los tiempos de vida medio ( $\langle\tau\rangle$ ) de los estados electrónicos excitados aumentaron con la concentración de ambos compuestos y disminuyeron con la temperatura como consecuencia del aumento de la fracción del dímero en los correspondientes equilibrios monómero/dímero (Figura 4.3.).

Las constantes de dimerización ( $K_D$ ) y los tiempos de vida media de los estados electrónicos excitados de las formas monómeras ( $\tau_0 = \tau_{\text{monómero}}$ ) y dímeras ( $\tau_\infty = \tau_{\text{dímero}}$ ) de **3** y **4** se determinó a partir del análisis de los perfiles de decaimiento de fluorescencia a diferentes concentraciones y temperaturas (Tabla 4.2.). Sorprendentemente, la tendencia a dimerizar de **3** y **4** es aproximadamente de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que la del derivado de *o*-xilileno **1** ( $570\text{--}120\text{ M}^{-1}$ ).<sup>9</sup>



**Figura 4.3.** Gráficos de la variación de la vida media de fluorescencia ponderada ( $\langle\tau\rangle$ ) en función de la temperatura (de 5 a 45 °C) y de la concentración de **3** (izquierda) o **4** (derecha) en solución acuosa.

El perfil de la gráfica de las isotermas de la Figura 4.3., donde se alcanza una meseta a concentraciones mucho más bajas para **3** que para **4**, sugieren unos valores de  $K_D$  para la formación de **3**-dímeros mayores que para **4**-dímeros.

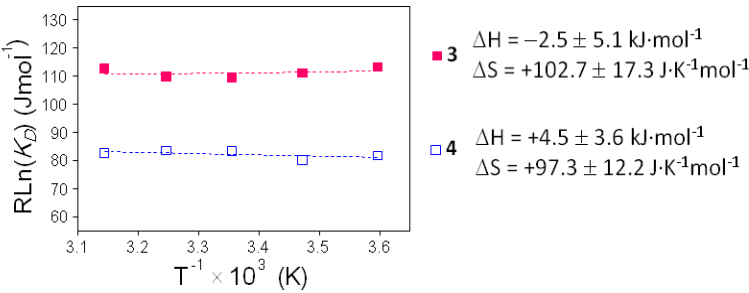
Los valores obtenidos lo confirman: el compuesto **3** presenta constantes de dimerización (entre  $4.1$  a  $8.0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) consistentemente superiores a las de **4** (entre  $1.4$  a  $2.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) en todo el rango de temperaturas estudiado.

Por otro lado, las vidas promedio a una concentración infinita se atribuyen al dímero. Estas son significativamente mayores para **4** ( $67.5 - 79.8 \text{ ns}$ ) que para **3** ( $11.0 - 11.9 \text{ ns}$ ), lo que apunta a diferencias considerables en la estructura de los dímeros correspondientes y refuerza la idea de que el segmento naftileno está probablemente mejor protegido del disolvente en el **4**-dímero que en el **3**-dímero.

**Tabla 4.2.** Valores de las constantes de dimerización ( $K_D$ ) y tiempo de vida media del estado electrónico excitado para el monómero ( $\tau_{\text{monómero}}$ ) y el dímero ( $\tau_{\text{dímero}}$ ) de **3** (arriba) y **4** (debajo).

3	Temperatura (°C)	$10^{-5}K_D$ (M <sup>-1</sup> )	$\tau_{\text{monómero}}$ (ns)	$\tau_{\text{dímero}}$ (ns)
	5	$8.0 \pm 1.5$	$2.7 \pm 0.4$	$11.9 \pm 0.2$
	15	$5.6 \pm 0.9$	$2.8 \pm 0.3$	$11.9 \pm 0.2$
	25	$4.1 \pm 0.6$	$2.3 \pm 0.3$	$11.6 \pm 0.2$
	35	$5.6 \pm 1.3$	$2.0 \pm 0.4$	$11.4 \pm 0.2$
	45	$6.8 \pm 1.2$	$2.4 \pm 0.3$	$11.0 \pm 0.2$

4	Temperatura (°C)	$10^{-4}K_D$ (mM <sup>-1</sup> )	$\tau_{\text{monómero}}$ (ns)	$\tau_{\text{dímero}}$ (ns)
	5	$1.8 \pm 0.2$	$3.2 \pm 0.8$	$77.9 \pm 3.1$
	15	$1.4 \pm 0.2$	$2.6 \pm 0.8$	$79.8 \pm 3.8$
	25	$2.1 \pm 0.5$	$2.4 \pm 1.3$	$74.4 \pm 4.6$
	35	$2.2 \pm 0.3$	$2.3 \pm 0.8$	$69.7 \pm 2.6$
	45	$1.9 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.8$	$67.5 \pm 3.0$



**Figura 4.4.** Representaciones lineales de Van't Hoff con indicación de la contribuciones entálpicas y entrópicas resultantes del proceso de dimerización de **3** y **4**.

A partir de las constantes de dimerización obtenidas a diferentes temperaturas recogidas en la Tabla 4.2 se obtienen las representaciones lineales de Van't Hoff mostradas en la Figura 4.4. junto a los parámetros termodinámicos de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  que se deducen para **3** y **4**.

Las interacciones intermoleculares favorables electrostáticas o de Van der Waals generalmente se caracterizan por valores de  $\Delta H$  elevados y negativos,<sup>10</sup> mientras que las fuerzas hidrófobas, que tienden a reducir la superficie hidrófoba de los segmentos no polares del compuesto, poseen valores de  $\Delta H$  cercanos a cero o ligeramente positivos. Además, los valores de  $\Delta S$  son elevados y favorables para la dimerización de **3** y **4**, por lo que son las interacciones hidrofóbicas la fuerza motriz del proceso. Esto puede atribuirse a una pérdida de capas de solvatación durante la dimerización debido al gran tamaño del grupo naftaleno, superior a la disminución de la entropía intrínseca causada por la pérdida de grados de libertad durante la dimerización. Por tanto, los datos experimentales ponen de manifiesto la importancia del grupo dimetilnaftileno en el proceso de dimerización.

El estudio de las propiedades de autoasociación de **3** y **4** en agua mediante RMN se dificulta por su baja solubilidad en este disolvente. El empleo de disolventes deuterados apróticos como  $\text{CDCl}_3$  tampoco permitió observar cambios con la concentración o la temperatura, como es de esperar de procesos gobernados por interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, los espectros obtenidos en MeOD y mezclas de MeOD- $\text{D}_2\text{O}$  varían con las condiciones de temperatura y concentración de la muestra lo que indica la existencia de un proceso de autoasociación con carácter hidrofóbico. Sin embargo, en los experimentos ROESY de **3** y **4** no se observan señales de cruce entre los protones aromáticos y los de la cavidad de la  $\beta\text{CD}$  (H-3 y H-5), lo que descarta la existencia de procesos de inclusión intra o intermolecular.

#### 4.2.3. Estudio de las propiedades conformacionales.

Con el propósito de obtener información acerca de la conformación de **3** y **4** y de los posibles cambios que puedan producirse en la orientación del grupo aromático respecto a la estructura de la CD al dimerizar se llevaron a cabo, en colaboración con el grupo del Prof. Francisco Mendicuti de la Universidad de Alcalá de Henares, experimentos de extinción de fluorescencia, dicroísmo circular y estudios computacionales.

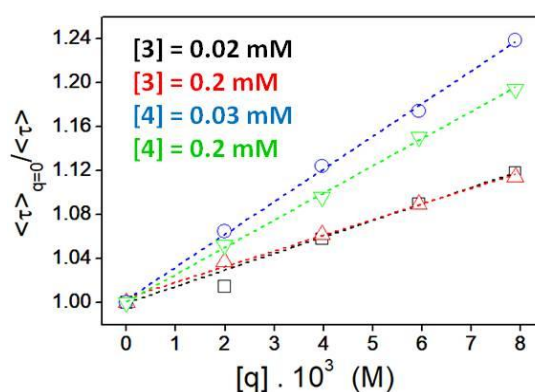
Los valores de  $k_q$  proporcionan una evaluación cualitativa de las diferencias en la accesibilidad al atenuador siempre y cuando los compuestos posean del mismo cromóforo. Cuanto menor es el valor de  $k_q$ , menos accesible es el cromóforo.

Para los experimentos de extinción de fluorescencia se utilizó diacetilo como atenuador ( $q$ ) y se midieron a 25 °C soluciones acuosas de los compuestos **3** y **4** a dos concentraciones diferentes (0.02 y 0.2 mM para **3** y, 0.03 y 0.2 para **4**). Las fracciones molares del dímero de **3** en estas condiciones de temperatura y concentración son de 0.69 y 0.88. Las del compuesto **4**, por su lado, son 0.25 y 0.53, respectivamente. A partir de los tiempo de vida media de fluorescencia de estas soluciones a diferentes concentraciones de extintor (de 0 a 8 mM) ( $\langle\tau\rangle_{q=0}/\langle\tau\rangle$  vs  $[q]$ ) se obtiene la representación de Stern-Volmer.<sup>11</sup> El resultado obtenido es una línea (Figura 4.5.) que permite calcular el valor de las constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) y de las constantes de extinción bimoleculares ( $k_q$ ) (Tabla 4.3.).

Los cambios en la concentración de **3** no afectan a  $k_q$  (Figura 4.5., líneas negra y roja), lo que sugiere que el grupo 1,8-dimetilnaftileno está expuesto de manera similar en su forma monómera y dímera ( $k_q = 1.4 \cdot 10^9 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) sin que la dimerización provoque cambios en la exposición del anillo al atenuador. El caso contrario se observó para **4**, cuyo valor de  $k_q$  disminuye en aproximadamente un



15% al aumentar a la concentración más alta ensayada (de  $k_q = 0.6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $k_q = 0.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , Figura 4.5., líneas verde y azul), lo que indica que el grupo 2,3-dimetilnaftileno es menos accesible para el atenuador en el dímero de **4** que en el monómero. En este caso, los datos podrían interpretarse como el blindaje de los dos clips aromáticos entre la estructuras de las  $\beta$ CD que dimerizan. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de diferencias sustanciales en las estructuras de los dímeros de **3** y **4**.



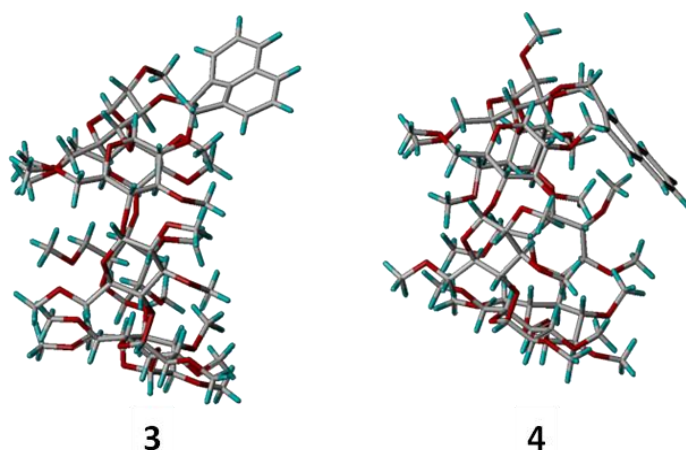
**Figura 4.5.** Representaciones de Stern-Volmer de **3** y **4** a diferentes concentraciones.

**Tabla 4.3.** Parámetros de la gráfica de Stern-Volmer para la extinción de **3** y **4** por diacetilo a diferentes concentraciones a 25 °C.

CD (mM)	$X_{\text{dímero}}$	$\langle \tau \rangle_{q=0}$ (ns)	$K_{\text{SV}} (\text{M}^{-1})$	$k_q \cdot 10^{-9} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
<b>3</b>				
0.02	0.69	$10.5 \pm 0.1$	$15.0 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.1$
0.2	0.88	$10.3 \pm 0.1$	$14.3 \pm 0.6$	$1.4 \pm 0.1$
<b>4</b>				
0.03	0.25	$45.6 \pm 0.1$	$29.7 \pm 0.7$	$0.6 \pm 0.3$
0.2	0.53	$49.5 \pm 0.1$	$24.7 \pm 0.5$	$0.5 \pm 0.2$

Además, para todas las concentraciones ensayadas, los valores de  $k_q$  son menores para **4** que para **3**, indicando que el grupo 2,3-dimetilnaftileno de **4** está menos expuesto al atenuador que el 1,8-dimetilnaftileno de **3** tanto en su forma monómera como dímera (Tabla 4.3.). Esto sugiere grandes diferencias entre ambos compuestos también en la orientación del grupo aromático con respecto a la estructura general de la CD.

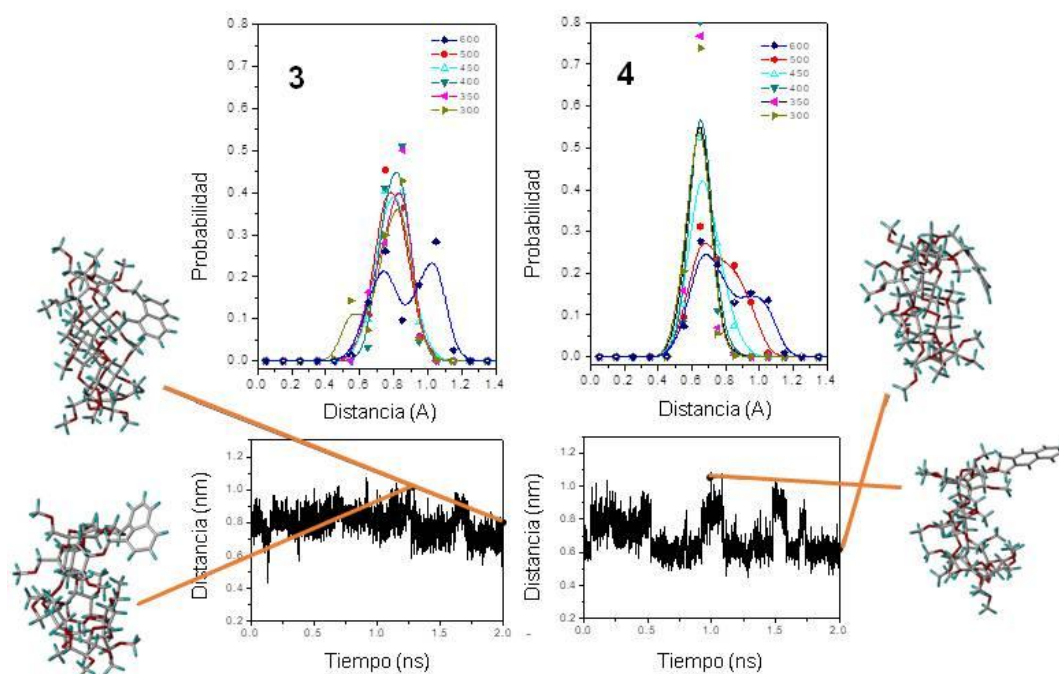
Con objeto de profundizar en el estudio conformacional de ambos compuestos, se llevaron a cabo estudios computacionales de mecánica y dinámica molecular (MM y MD). En la Figura 4.6. se representan las estructuras de **3** y **4** de mínima energía en su forma monómera, adquiriendo preferentemente una disposición abierta y semiabierta, respectivamente.



**Figura 4.6.** Estructuras de mínima energía calculadas para **3** y **4**.

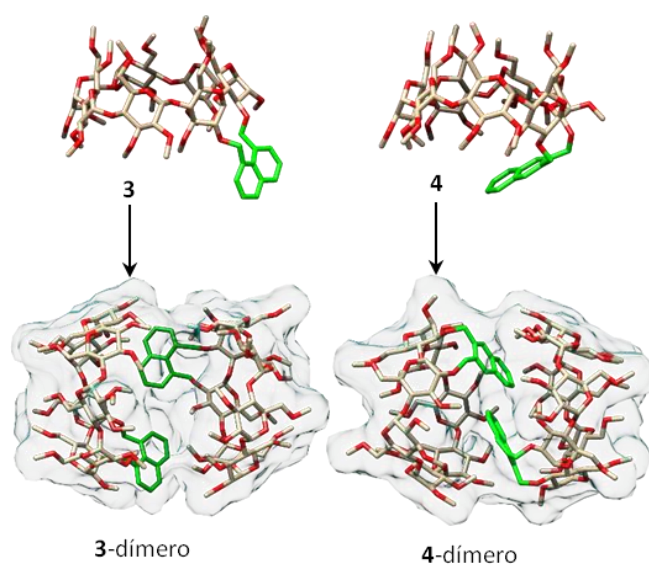
Dicha conformación se ha utilizado como punto de partida para el cálculo de las trayectorias de 2 ns de dinámica molecular en vacío a diferentes temperaturas. En la Figura 4.7. se muestran las distribuciones de probabilidad de las distancias entre el centro de masa del grupo naftileno y del macroanillo de la

CD **3** y **4**. El movimiento del clip 2,3-di-O-metilnaftileno mostraba una amplitud significativamente mayor que el de 1,8-di-O-metilnaftileno, de acuerdo con la mayor flexibilidad del compuesto **4** propuesta en base a los experimentos de  $^1\text{H}$  RMN.

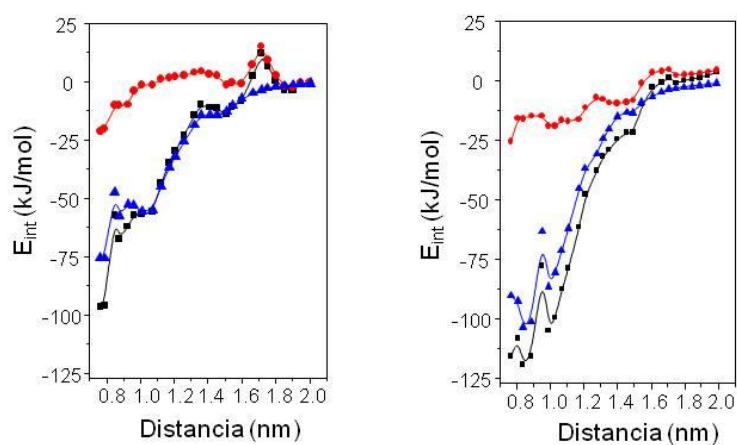


**Figura 4.7.** Arriba: distribución de probabilidad de la distancia entre el centro de masa del macroanillo de **3** (izquierda) y **4** (derecha) y el grupo naftilo. Abajo: historias de las distancias a 450 K. Laterales: estructuras referidas.

Los datos de MM también fueron consistentes con la tendencia observada de **3** y **4** a formar dímeros que enfrentan sus segmentos aromáticos, cuyas estructuras calculadas de mínima energía se muestran en la Figura 4.8. En ambos casos se forman dímeros estables, siendo las fuerzas atractivas de Van der Waals la contribución más importante a la energía de estabilización de los dímeros (Figura 4.9.).



**Figura 4.8.** Estructuras optimizadas (MM) de **3** y **4** y estructuras MBE de los correspondientes dímeros.

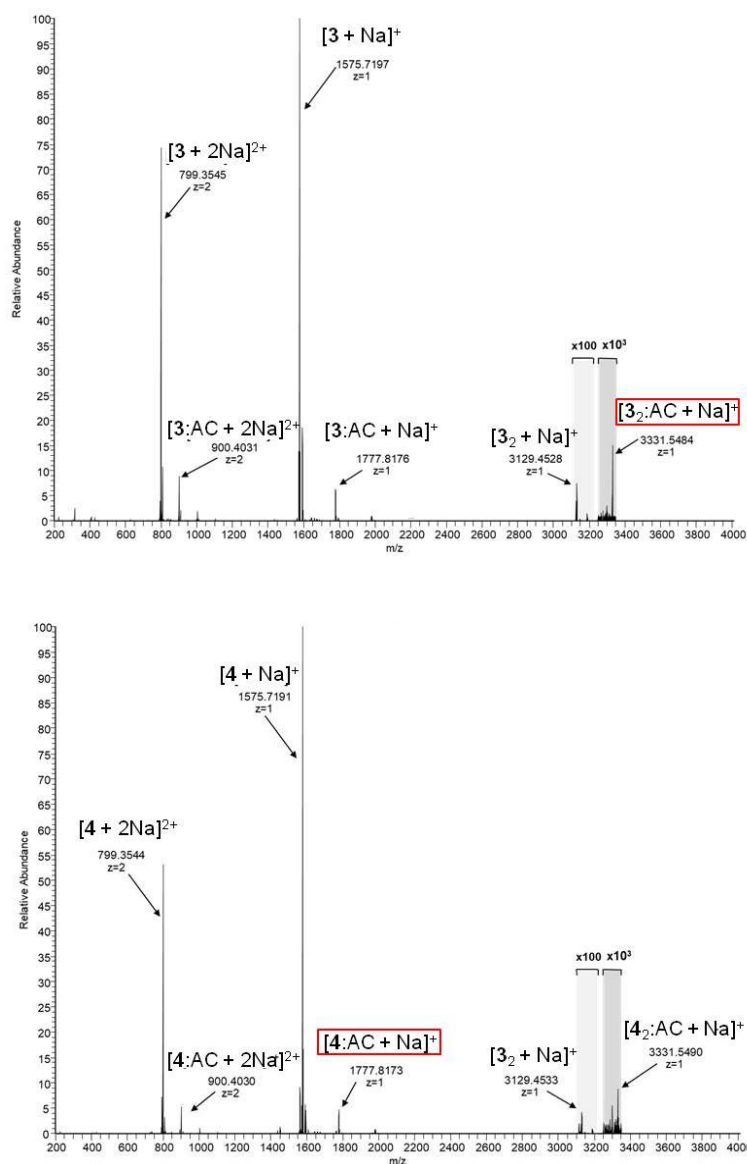


**Figura 4.9.** Representación de los cambios en las energías de interacción (■), electrostática (●) y las contribuciones de van der Waals (▲) de **3** (izquierda) y **4** (derecha) en función de la distancia obtenidas por aproximación a lo largo del eje y definido por el centro de masa de los oxígenos glucosídicos.

Los datos obtenidos mediante experimentos de dicroísmo circular inducido también sugieren importantes diferencias conformacionales en los dímeros formados. El dímero de **3** forma una cavidad tubular extendida en la que los grupos 1,8-di-O-dimetilnaftileno se comportan como módulos de extensión de cavidad, mientras que en el dímero de **4** los segmentos de 2,3-di-O-metilnaftileno actúan como elementos de separación entre las dos cavidades de las CDs. Las diferencias conformacionales observadas en las formas monómeras y dímeras de los compuestos **3** y **4** conduce a profundizar en el estudio de la influencia en sus propiedades de inclusión y en su impacto en la estabilidad del dímero.

#### 4.2.4. Estudio de la capacidad de complejación del adamantano carboxilato (AC).

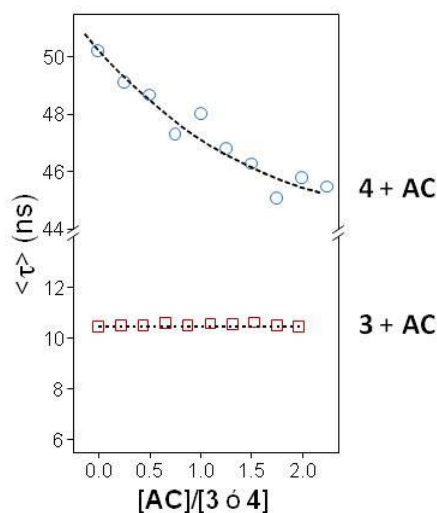
En un estudio preliminar en colaboración con el Dr. C. Przybylski (Sorbonne Université, París, Francia) en el que se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución muestras de **3** y **4** en presencia de **AC** se pudo observar la formación de distintas especies de complejos CD:AC. En el caso de **3**, se detectó un pico pseudomolecular relativamente intenso compatible con el huésped de **AC** incluido en **3**-dímero intacto (complejo **3**<sub>2</sub>:**AC**,  $m/z$  3331.5). Sin embargo, en el caso de **4** se observó la formación preferente del complejo 1:1 **4**:**AC** ( $m/z$  1777.8), sugiriendo que la inclusión de **AC** causa la disrupción del dímero de **4** (Figura 4.10.).



**Figura 4.10.** Espectros de masas HR-ESI de una solución acuosa de **3:AC** (arriba) y **4:AC** (abajo) en proporción 1:4.

Se realizaron experimentos de espectroscopía de fluorescencia añadiendo de forma secuencial alícuotas de **AC** a soluciones acuosas de ambos

compuestos. La adición de **AC** no produce cambios significativos en la vida media de los estados electrónicos excitados  $\langle\tau\rangle$  de **3**, mientras que para el experimento similar llevado a cabo con **4** supone una disminución importante en  $\langle\tau\rangle$ . Esto implica que la adición de **AC** produce un aumento en la proporción del monómero **4**, que posee una vida media más corta, a expensas de **4**-dímero (Figura 4.11.).



**Figura 4.11.** Gráficos de las variaciones de vida media de fluorescencia ( $\langle\tau\rangle$ ) a 25 °C de soluciones acuosas de **3** y **4** ( $1.36 \cdot 10^{-4}$  M) a concentraciones crecientes de **AC**.

Se realizaron experimentos de valoración por  $^1\text{H}$  RMN en medios acuosos tamponados a 25 °C con objeto de confirmar la formación de complejos supramoleculares entre **AC** y **3** o **4**. Los cambios en las señales de protones inducidos por la adición de proporciones crecientes de **AC** a la solución 0.5 mM de **3** (fracción molar del **3**-dímero superior al 90 %) (Figura 4.12.) proporcionaron isotermas de valoración que se adaptaron bien a un modelo de ajuste 1:1 entre **3**-dímero y **AC**, es decir, una estequiometría 2:1 basada en el monómero de **3**.

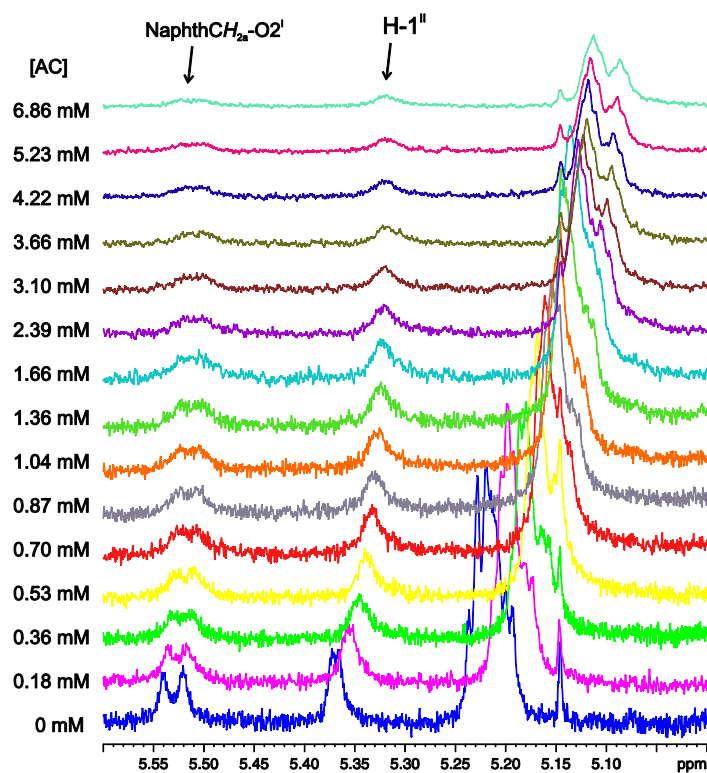


Figura 4.12. Región seleccionada de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del experimento de valoración de **3:AC**.

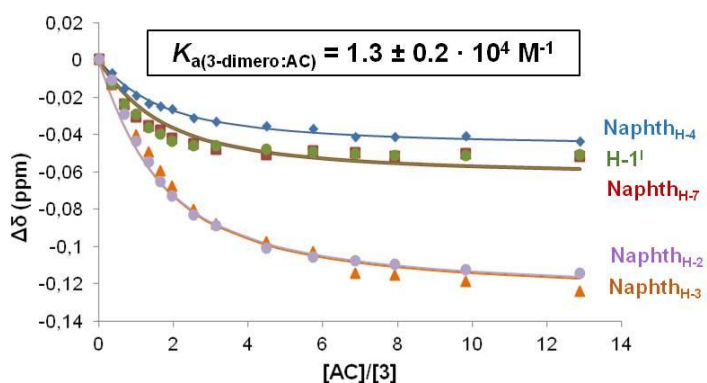
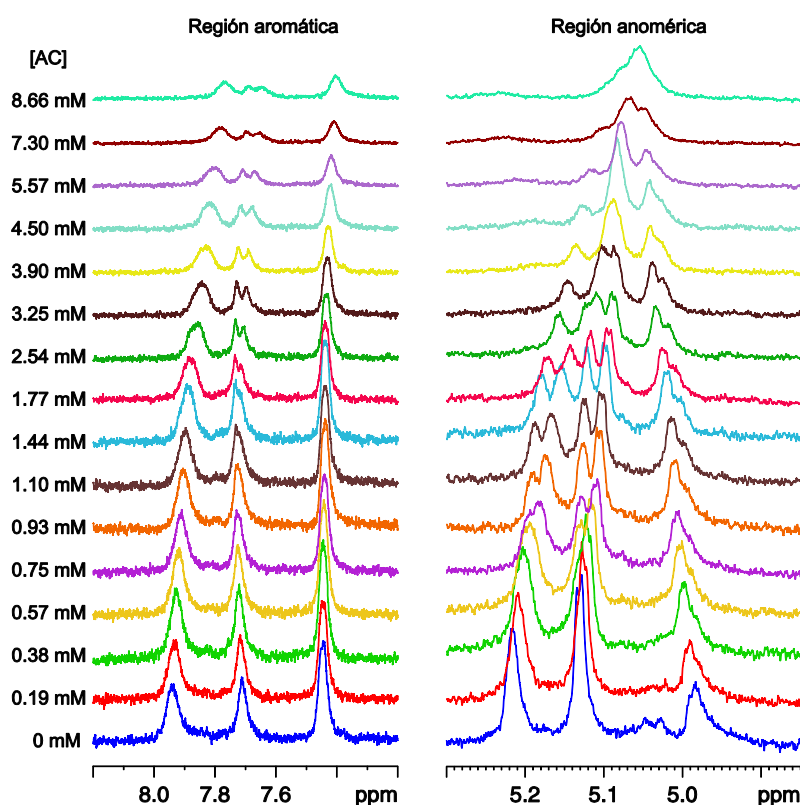


Figura 4.13. Isotermas de valoración obtenidas por  $^1\text{H}$ -RMN de la complejación de **3** y **AC**, con indicación de la constante de asociación resultante para el correspondiente complejo 2:1 ( $K_{\text{a(2:1)}}$ ).

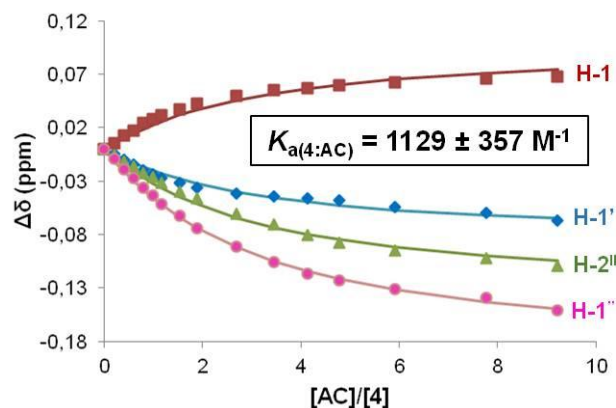


Mediante el ajuste de mínimos cuadrados se determinó que el valor de la constante de asociación aparente que rige el proceso de complejación es  $K_a = 1.3 \pm 0.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Figura 4.13.), muy superior a los valores determinados para el derivado permetilado **58** ( $K_a = 1262 \pm 130 \text{ M}^{-1}$ ) y o-xililenado **1** ( $K_a = 5489 \pm 1353 \text{ M}^{-1}$ ) a través del mismo método.<sup>9</sup>

Se llevó a cabo un experimento de valoración por  $^1\text{H}$ -RMN similar para el compuesto **4**. En la Figura 4.14. se muestran los desplazamientos de las señales de la región aromática y anomérica a concentraciones crecientes de **AC**.



**Figura 4.14.** Región seleccionada de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del experimento de valoración de **4:AC**.

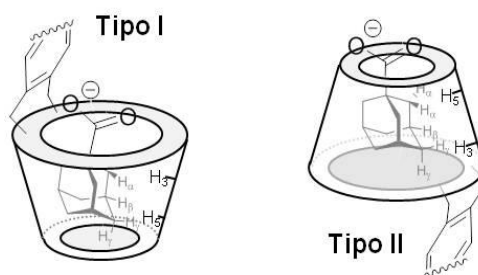


**Figura 4.15.** Isotermas de valoración obtenidas por  $^1\text{H}$ -RMN de la complejación de **4** y AC, con indicación de la constante de asociación resultante para el correspondiente complejo 1:1 ( $K_{a(1:1)}$ ).

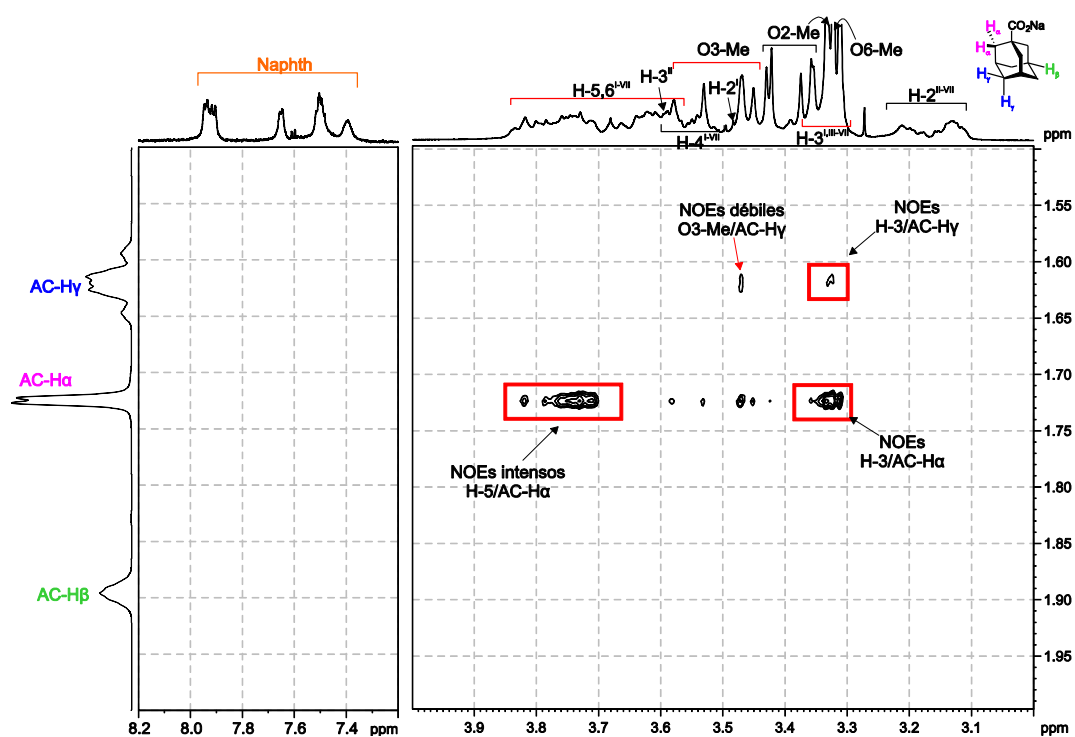
Las isotermas de valoración obtenidas proporcionaron un valor de  $K_a$  aparente de  $1129 \pm 357 \text{ M}^{-1}$  ajustada para la formación de un complejo 1:1 entre la forma monómera de **4** y AC. Este valor probablemente subestime la afinidad de AC por **4** debido a que la formación del complejo **4**:AC requiere la disrupción del dímero de **4** (Figura 4.15.).

A pesar de la gran cantidad de información descrita acerca de los complejos entre  $\beta$ CDs y derivados de adamantano durante más de 50 años, la orientación que adopta el huésped en el interior de la CD continúa siendo controvertida. Los sustituyentes hidrófilos cargados negativamente, tales como el grupo carboxilato del AC, no se incluyen en la cavidad hidrofóbica, pero no está claro si sobresalen de la cara secundaria más amplia (complejo tipo I) o de la cara primaria más estrecha (complejo tipo II).<sup>12</sup> Un estudio reciente demuestra que ambos tipos de complejos coexisten en proporciones similares en el caso del complejo entre el AC y la  $\beta$ CD per-O-metilada.<sup>13</sup> Modificaciones en la estructura de la  $\beta$ CD pueden definir la orientación preferida del huésped, y esta se puede determinar mediante el análisis comparativo de los contactos NOE (o

ROE) entre los protones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del **AC** y los protones H-3 y H-5 de la  $\beta$ CD situados en el interior de la cavidad (Figura 4.16.).



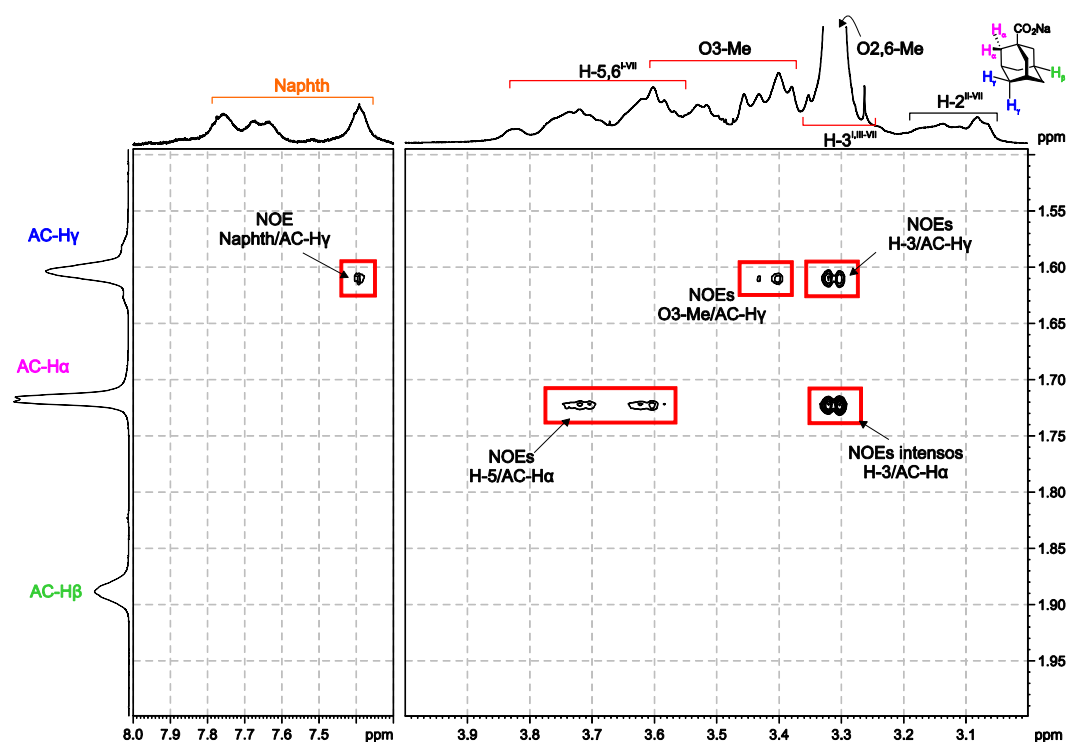
**Figura 4.16.** Representación de los complejos tipo I y II entre **AC** y derivados de  $\beta$ CD con clips aromáticos. Se indican los contactos NOE esperados en cada caso.



**Figura 4.17.** Regiones seleccionadas del espectro 2D NOESY de RMN (600 MHz,  $D_2O$ ) de **3:AC** ( $[3] = 0.53$  mM,  $[AC] = 18$  mM) a pD 7.4 (tampón fosfato 0.1 M). Tiempo de mezcla 0.8 s.

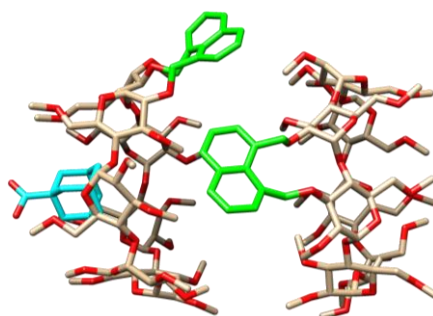
La asimetría de los compuestos **3** y **4** y la superposición de las señales imposibilita la cuantificación precisa de los tipos de complejos que forman. Sin embargo, el estudio cualitativo del espectro NOESY de los complejos formulados con **AC** muestran una disposición predominante de tipo II para el compuesto **3** al observar fuertes contactos entre H-5/H- $\alpha$  y entre H-3/H- $\gamma$  (Figura 4.17.).

Para los complejos de **4** se observaron contactos NOE más intensos entre H-3/H- $\alpha$  y H-5/H- $\gamma$  lo que indica la presencia de una proporción mucho mayor de complejo tipo I (Figura 4.18.).

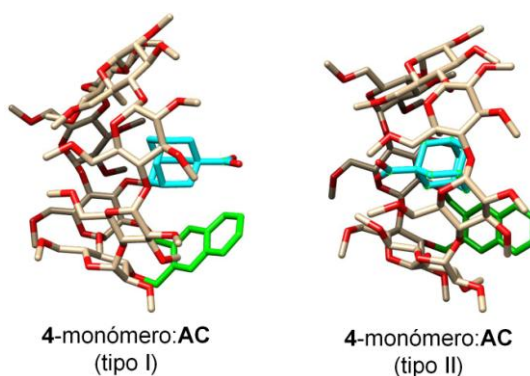


**Figura 4.18.** Regiones seleccionadas del espectro 2D NOESY de RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) de **4:AC** ([**4**] = 0.94 mM, [**AC**] = 19.5 mM) a pD 7.4 (tampón fosfato 0.1 M). Tiempo de mezcla 0.8 s.

Conviene destacar que acceder a la cavidad de la CD a través de la cara secundaria debe verse seriamente obstaculizado en los dímeros cabeza-cabeza que forman **3** y **4**. Por tanto, la entrada del **AC** se debe encontrar favorecida a través de la cara primaria formando complejos de tipo II. En el caso de **3**-dímero, la especie ternaria resultante permanece estable (Figura 4.19.).



**Figura 4.19.** Estructura MBE del complejo ternario formado por **3**-dímero y **AC**



**Figura 4.20.** Estructura MBE del complejo formado por **4**-monómero y AC tipo I (izquierda) y tipo II (derecha).

Sin embargo, a diferencia de **3**, los contactos NOE entre protones aromáticos de **4** y protones adamantinos mostrados en la Figura 4.18. indican que también se forman complejos tipo I. La inclusión de **AC** en **4**-dímero probablemente debilita las interacciones intermoleculares entre los grupos naftalenos al afectar a la orientación del clip aromático, lo que conduce a la disociación del dímero. Se forma un complejo 1:1 **4:AC** y se libera una molécula de **4**. La inclusión a través de la cara secundaria se vuelve así factible, permitiendo el equilibrio entre los complejos **4:AC** tipo I al acercarse el **AC** por la cara secundaria de **4** y tipo II al acercarse por la cara primaria (Figura 4.20.).

### 4.3. Conclusiones

Se han sintetizado dos regioisómeros de  $\beta$ CD con segmentos de naftaleno doblemente unidos que les proporciona la capacidad de autoensamblarse en dímeros supramoleculares cabeza-cabeza en solución acuosa. Los elementos aromáticos 1,8- (**3**) o 2,3-dimetilnaftileno (**4**) se unen a dos posiciones de la cara secundaria de unidades consecutivas de glucosa (O-2' y O-3'') a través de puentes tipo éter benzílico. Esta alteración de la estructura de la CD produce diferencias significativas en las propiedades conformacionales y en la estabilidad de los dímeros que forman. Experimentos de MS, RMN, fluorescencia y dicroísmo circular lo corroboran. De tal forma, el **3**-dímero adopta una disposición tubular muy estable en la que los grupos aromáticos adoptan una conformación abierta, actúan esencialmente como paredes que extienden las caras secundarias de ambos componentes monómeros dejando expuestas las caras primarias. Sin embargo, en el dímero de **4** los segmentos aromáticos poseen una mayor flexibilidad y pueden adoptar disposiciones casi de tapadera, actuando como segmentos plegables que separan las unidades individuales de la CD. Estas diferencias conformacionales y estructurales condicionan aún más

las propiedades de inclusión: el dímero de **3** puede incluir una molécula de **AC** y formar una especie ternaria estable de dímero de **3:AC** mientras que el mismo huésped desencadena la interrupción del dímero de **4**.

El enfoque sintético es compatible con la incorporación de elementos funcionales en las posiciones primarias del ciclooligosacárido, por ejemplo, para el reconocimiento biomolecular. La posibilidad de implementar diferentes niveles de organización supramolecular (por ejemplo, asociación y/o inclusión y/o disociación temporal controlada) con clips aromáticos ofrece una herramienta valiosa para programar el comportamiento de dispositivos basados en CD en entornos biológicos.

Estos resultados han sido publicados en el artículo titulado “Dynamic Control of the Self-Assembling Properties of Cyclodextrins by the Interplay of Aromatic and Host-Guest Interactions” en la revista *Frontiers in Chemistry* (*Front. Chem.* **2019**, 7, 72).

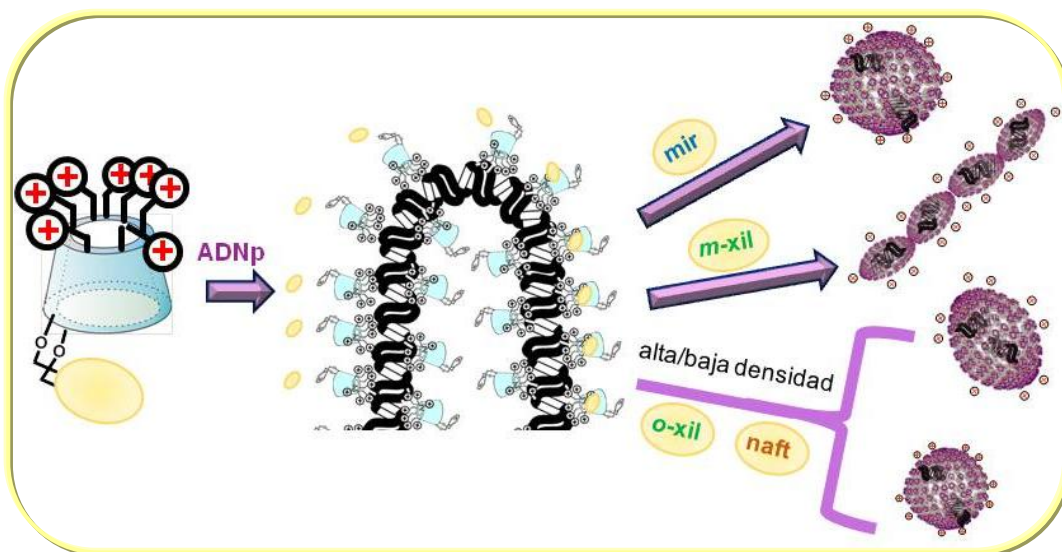
- 
- <sup>1</sup> M. R. Gamiieldien, I. Maestre, C. Jaime, K. J. Naidoo, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 452-459.
- <sup>2</sup> a) M. J. González-Álvarez, A. Mendez-Ardoy, J. M. Benito, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Photochem. Photobiol. A* **2011**, *223*, 25-36; b) M. J. González-Álvarez, J. M. Benito, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 5472-5485.
- <sup>3</sup> M. J. González-Álvarez, P. Balbuena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13717-13729; b) M. J. González-Álvarez, J. Vicente, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, F. Mendicuti, *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 975-988.
- <sup>4</sup> W. Kemp, I. T. Storie, C. D. Tulloch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2812-2817.
- <sup>5</sup> a) S. Xiao, M. Yang, P. Sinaÿ, Y. Blériot, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1510-1516; b) B. Roizel, J. P. Baltaze, P. Sinaÿ, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2371-2373.
- <sup>6</sup> a) A. Kusmin, R. E. Lechner, M. Kammeland W. Saenger, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 12888-12898; b) E. B. Starikov, K. Bräsicke, E. W. Knapp, W. Saenger, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *336*, 504-510.
- <sup>7</sup> S. Filippone, F. Heimann, A. A. Rassat, *Chem. Commun.* **2002**, 1508-1509.
- <sup>8</sup> J. W. Park, H. E. Song, S. Y. Lee, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 5177-5183.
- <sup>9</sup> T. Neva, T. Carmona, J. M. Benito, C. Przybylski, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5588-5597.
- <sup>10</sup> a) N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521-533; b) E. E. Meyer, K. J. Rosenberg, J. Israelachvili, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15739-15746; c) B. Kronberg, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *22*, 14-22.
- <sup>11</sup> J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, **2008**, p 280.
- <sup>12</sup> a) R. Krishnan, A. M. Rakhi, K. R. Gopidas, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 25004-25014; b) R. F. Gómez-Biagi, R. B. C. Jagt, M. Nitz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4622-4626; c) V. Rüdiger, A. Eliseev, S. Simova, H.-J. Schneider, M. J. Blandamer, P. M. Cullis, A. J. Meyer, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 2119-2123.
- <sup>13</sup> C. Schönbeck, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 4821-4827.



# Capítulo 5

## Ciclodextrinas policationicas equipadas con elementos promotores de autoasociación: coensamblaje con ADN y evaluación de su capacidad como vectores de genes.

Controlar las propiedades supramoleculares de CDs policationicas con potencial como sistemas de transporte de genes empleando diferentes plataformas oligosacáridicas, clústers policationicos y elementos funcionales (*o*- y *m*-xilileno, 1,8-dimetilnaftileno y cadenas de miristoílo). Estos dirigen su coorganización en presencia de ADN como forma de actuar sobre las propiedades conformacionales de los nanocomplejos resultantes y sobre su capacidad de mediar la transfección.



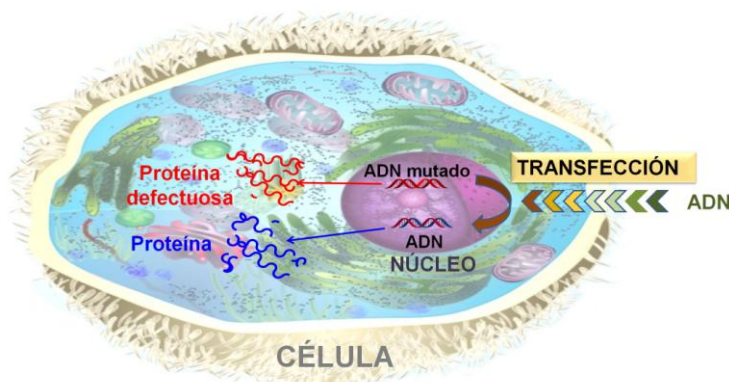


## **5. Ciclodextrinas policationicas equipadas con elementos promotores de autoasociación: coensamblaje con ADN y evaluación de su capacidad como vectores de genes.**

### **5.1. El paradigma de la terapia génica**

No es habitual en el desarrollo de agentes terapéuticos disponer del conocimiento que, a priori, permita el diseño de candidatos que aseguren una actividad biológica específica y selectiva. El procedimiento convencional seguido por el laboratorio farmacéutico implica el análisis de cientos (o miles) de candidatos potenciales a través de numerosos filtros y etapas, que muy excepcionalmente culminan con un producto en el mercado.<sup>1</sup> Los ácidos nucleicos constituyen el paradigma de lo contrario: su actividad biológica está perfectamente definida por su secuencia nucleotídica, es predecible y modulable. En la medida que pueden interferir específicamente con los mecanismos de expresión proteica, el potencial terapéutico de los ácidos nucleicos para revertir procesos patológicos asociadas a disfunciones del proteoma es enorme. El concepto de la terapia génica<sup>2</sup> justamente se basa en esto: la introducción de material génico que, explotando la maquinaria de transcripción celular, pueda corregir el mal funcionamiento celular que está en el origen de una patología (Figura 5.1.). Sin embargo, casi 50 años después de ser conceptualizado, su realización clínica sigue constituyendo un reto. El principal obstáculo radica en que las células están programadas para preservar su carga génica intacta, incluso cuando es deficiente, y evitar la incorporación de material génico exógeno, para lo cual disponen de barreras fisiológicas eficaces. La necesidad de un sistema de transporte adecuado que permita al material génico atravesar estas barreras y alcanzar con plena funcionalidad su diana terapéutica es de relevancia crítica. De hecho, existe un consenso generalizado en que el

éxito de la terapia génica está indisolublemente condicionado por el desarrollo de vectores de transfección eficaces y seguros.<sup>3</sup>



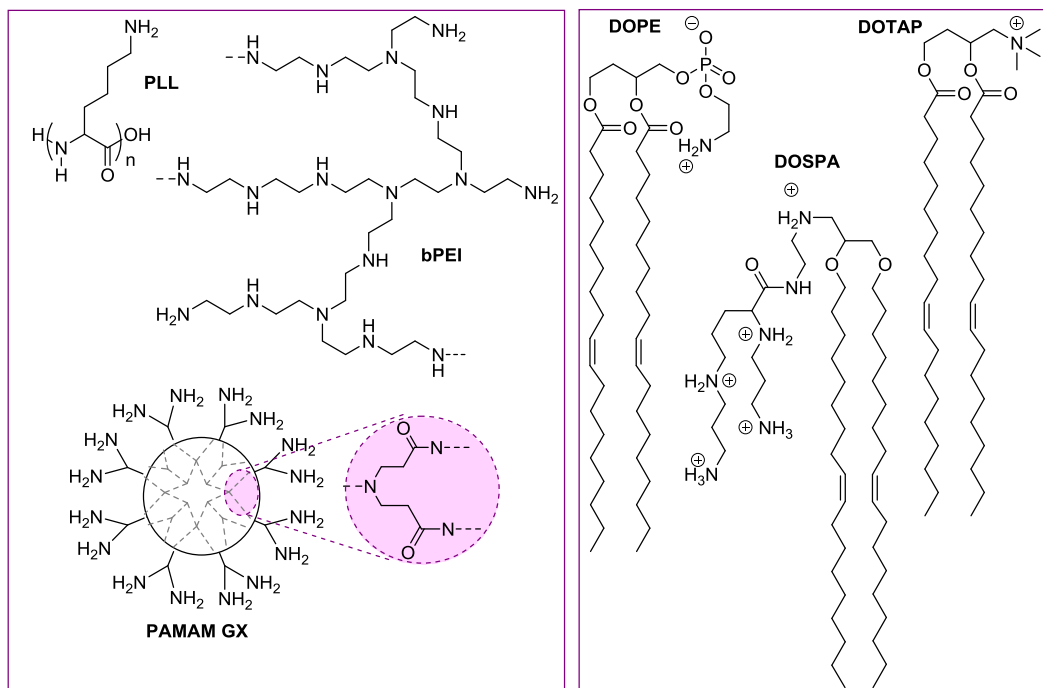
**Figura 5.1.** Ilustración del concepto de terapia génica.

## 5.2. Sistemas de transporte de ácidos nucleicos: vectores virales frente a vectores artificiales.

Dada su habilidad innata para infectar células y transferir material génico, los virus han sido la opción más estudiada para realizar esta función. Se han construido versiones de virus relativamente simples cuya carga génica se ha sustituido por genes terapéuticos.<sup>4</sup> A pesar de las perspectivas generadas a principio de la década de los 90, el ímpetu inicial se vio drásticamente ralentizado ante evidencias de inmunogenicidad y toxicidad de estos virus recombinantes.<sup>5</sup> Y es que, si los virus evolucionan para infectar células, el sistema inmune lo hace para combatir lo que entiende por un patógeno. El resultado es que, a día de hoy, y pese a que la mayor parte de los ensayos clínicos en curso se realizan con virus recombinantes,<sup>6</sup> el número de vectores aprobados para su comercialización es muy escaso. Como ejemplos, la comercialización de Luxturna™, la primera terapia génica en superar los filtros

de la *Food and Drug Administration* (FDA), no fue aprobada hasta 2017.<sup>7</sup> En 2018 la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) aprobó la comercialización de Kymriah® y solo 6 años antes, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó Glybera®. Estos tratamientos están dirigidos al tratamiento de patologías raras y en condiciones muy restrictivas. De hecho, Glybera® fue retirado del mercado en 2017 después de comercializar un solo tratamiento en ese periodo.<sup>8</sup>

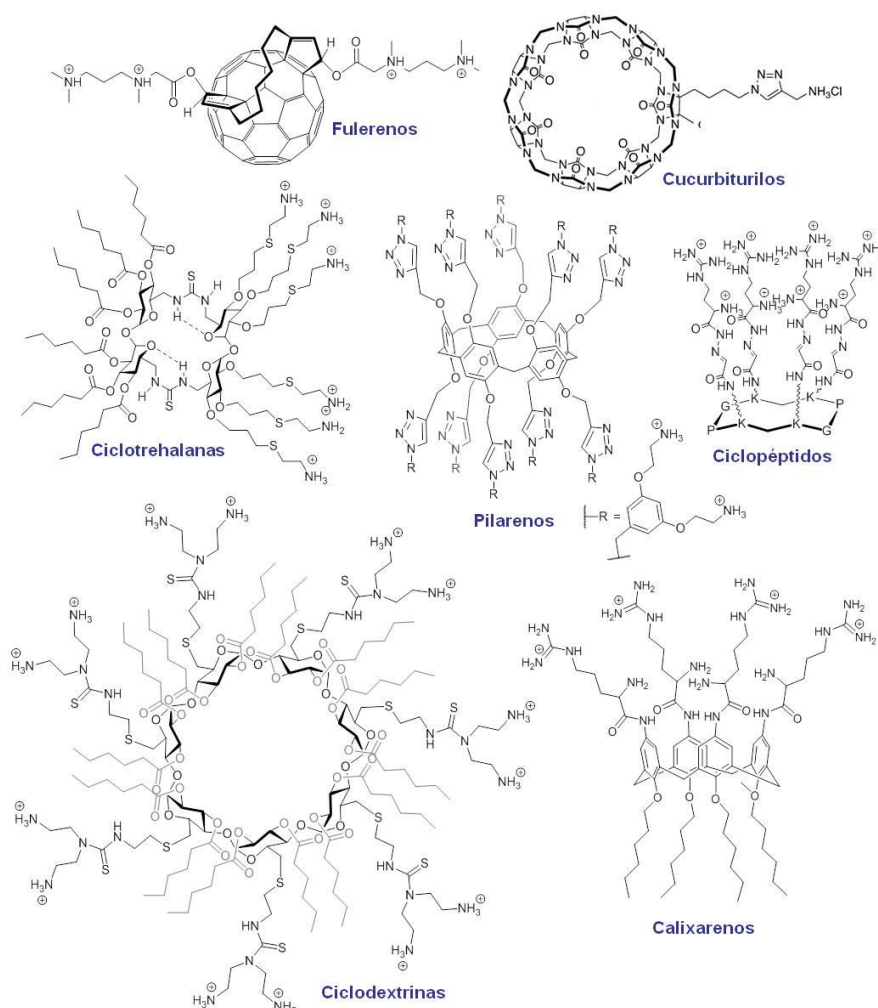
Aunque la investigación con vectores virales sigue siendo muy intensa, sus limitaciones inherentes han hecho que el foco se desplace hacia el desarrollo de sistemas no-virales (o artificiales).<sup>9</sup> Estos pueden, en principio, evitar los riesgos asociados a la inmunogenicidad inherente de los vectores virales pero, a pesar de la amplia variedad de sistemas explorados, su eficacia ha resultado limitada hasta el momento. De hecho, aun no existe un consenso claro sobre las propiedades (bio)físico-químicas ideales que un vector de genes debe mostrar. Y una razón para ello es que la mayor parte de los sistemas investigados (fundamentalmente polímeros<sup>10</sup> y lípidos catiónicos,<sup>11</sup> Figura 5.2.) carecen de una estructura bien definida o se emplean como formulaciones multi-componente. Cualquiera de las dos situaciones dificulta el desarrollo de estudios detallados de SAR (*structure-activity relationship studies*) que permitan la optimización de sus propiedades.



**Figura 5.2.** Ejemplos ilustrativos de polímeros (izquierda) y lípidos (derecha) catiónicos empleados como vectores no virales de genes.

La síntesis macromolecular de precisión, comentada brevemente en el Capítulo 1, ha permitido abordar el desarrollo de vectores no virales desde una perspectiva alternativa a la de los polímeros clásicos. A través del uso de transformaciones químicas regioselectivas de alta eficacia, especialmente metodologías sintéticas de tipo *click*,<sup>12</sup> la síntesis macromolecular de precisión es capaz de acceder a arquitecturas macromoleculares monodispersas con una disposición y orientación de los elementos funcionales predefinida, y modificarlas sistemáticamente. Esto es de gran utilidad para elaborar colecciones estructuralmente diversas con las cuales desarrollar estudios de correlación estructura-actividad anteriormente mencionados.<sup>13</sup> Las plataformas macromoleculares multifuncionales de conformación y estructura predefinida, por

su compatibilidad con esquemas de funcionalización de tipo click orientadas a la diversidad estructural, se han empleado con este fin.<sup>14</sup> De entre ellas, cabe destacar las ciclodextrinas y los calixarenos,<sup>15</sup> pero más recientemente se han sumado también fulerenos,<sup>16</sup> cucurbiturilos,<sup>17</sup> pilarenos,<sup>18</sup> ciclopéptidos<sup>19</sup> o ciclotrehalanas (Figura 5.3.).<sup>20</sup>



**Figura 5.3.** Ejemplos ilustrativos de vectores moleculares de genes basados en ciclodextrinas, calixarenos, fulerenos, cucurbiturilos, pilarenos, ciclopéptidos y ciclotrehalanas.

Cada una de estas plataformas moleculares dispone de un número de grupos funcionales orientados hacia el espacio de una manera particular (y eventualmente única) que resultan accesibles a la modificación química a través de estrategias de funcionalización (regio)selectivas. De este modo, con mayor o menor flexibilidad, es posible conferir o modular las propiedades supramoleculares, incluyendo la capacidad de autoensamblaje en presencia de ácidos nucleicos. La estrategia más exitosa en este sentido, generalizada a la práctica totalidad de plataformas moleculares, ha sido la elaboración de macromoléculas anfifílicas faciales (*facial amphiphiles*): estructuras *tipo Jano*,<sup>21,22</sup> funcionalizadas con dominios catiónicos y lipofílicos segregados, capaces de organizarse jerárquicamente alrededor de polianiones los como ácidos nucleicos, a través de interacciones multivalentes de origen electrostático y de condensar estos polielectrolitos a través de interacciones hidrofóbicas. Esto conduce a la formación de condensados de dimensiones nanométricas que protegen al oligonucleótido del entorno y facilitan su transporte a través de las barreras fisiológicas celulares. El esquema de condensación fue inicialmente postulado para explicar el autoensamblaje de paCDs alrededor de ADN para formar CDplejos,<sup>23</sup> (Figura 1.13.) aunque probablemente es extensible a otros sistemas basados en macromoléculas anfifílicas faciales.

Las propiedades biofísicas de las partículas resultantes, su dinámica de formación y disociación, la estabilidad, la capacidad de atravesar membranas biológicas y, en definitiva, la capacidad de promover la expresión del material génico que transportan dependen en gran medida del balance de hidrofilia/lipofilia de la estructura molecular.<sup>14</sup> Y, aunque el cuerpo de conocimiento no es aún suficiente para guiar el diseño de vectores con eficacia equiparable al de sistemas virales, la posibilidad de manipular las propiedades

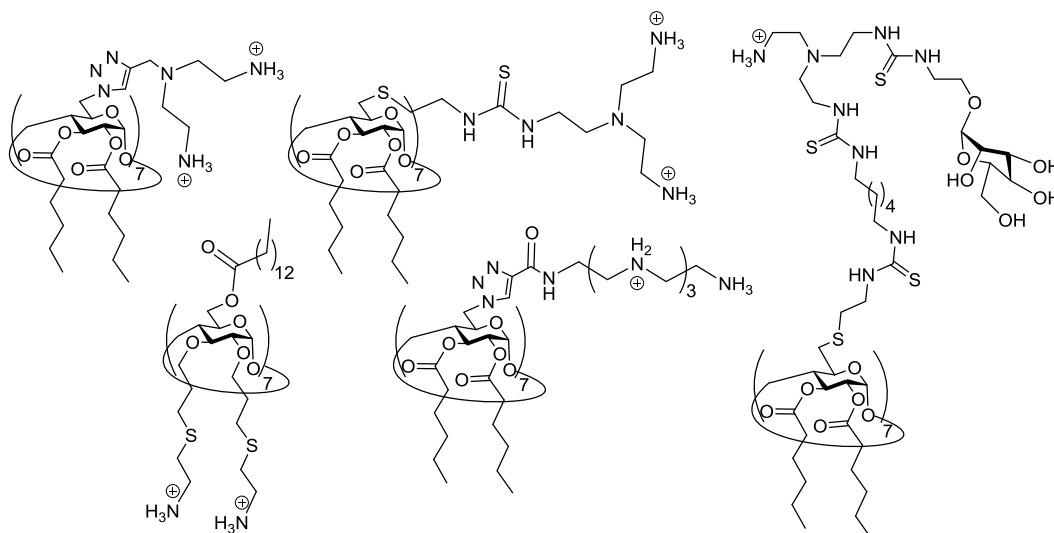


funcionales de sistemas autoensamblados de dimensiones nanométricas con herramientas sintéticas precisas resulta prometedora.

### 5.3. Sistemas de transporte de genes basados en ciclodextrinas

La presencia en las ciclodextrinas de dos caras (primaria y secundaria) y tres tipos de hidroxilos (OH-2, 3 y 6) de diferente reactividad es una característica inherente de esta familia de compuestos. La posibilidad de utilizar estos grupos para incorporar elementos funcionales con una presentación tridimensional precisa y controlable ha inspirado muchas de sus aplicaciones, algunas de las cuales se describen en el Capítulo 1. Uno de los ámbitos de aplicación de especial relevancia ha sido el transporte de genes.<sup>24</sup> Algunos diseños, como los polímeros descritos por Davis y colaboradores, que explotan la capacidad de las CDs para alojar huéspedes hidrofóbicos y organizar la disposición de los elementos funcionales del polímero, han alcanzado estadios avanzados de ensayos clínicos.<sup>25</sup> En lo que se refiere a diseños basados en estructuras molecularmente bien definidas, los trabajos pioneros de Darcy y O'Driscoll demostraron la capacidad de CDs homogéneamente funcionalizadas con grupos catiónicos en una de sus caras para autoorganizarse en presencia de ADN. A través de un mecanismo probablemente similar al propuesto para la interacción de polímeros catiónicos y ácidos nucleicos, estas CDs catiónicas (pCDs) daban lugar a condensados que promovían la internalización celular y expresión del material génico.<sup>26</sup> La naturaleza del elemento catiónico condiciona la capacidad de autoensamblaje y transfección.<sup>27</sup> La incorporación de dominios hidrofóbicos segregados en la cara opuesta de la plataforma de CD para producir moléculas con anfifilia facial (paCDs), condujo a un incremento de órdenes de magnitud en la eficacia de transfección.<sup>28</sup> La eficacia de las paCDs como vectores de genes está probablemente asociada a una protección más

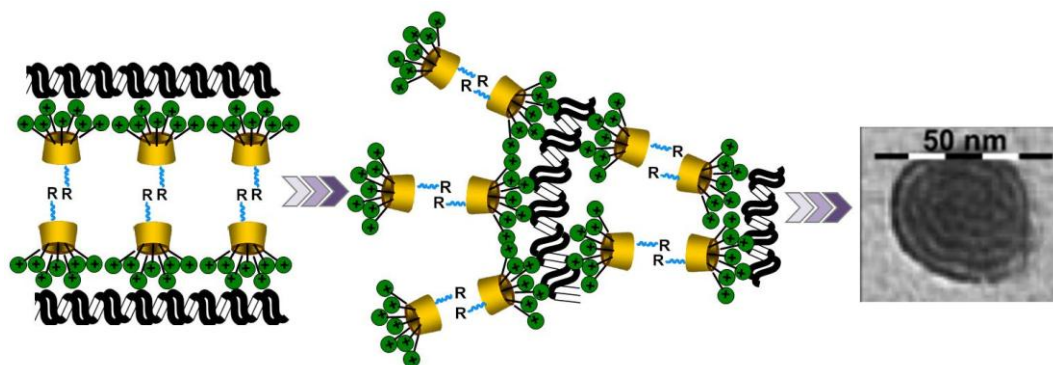
eficaz del ácido nucleico frente al medio biológico y a la mejor permeabilidad de los CDplejos (complejos paCD-ADN) frente a membranas biológicas. La versatilidad de las distintas aproximaciones sintéticas ha permitido desarrollar estudios exhaustivos de relación estructura-actividad para determinar los parámetros determinantes de cada una de las etapas del proceso de transfección (Figura 5.4.).<sup>29</sup>



**Figura 5.4.** Ejemplos ilustrativos de paCDs estudiadas como vectores moleculares de ácidos nucleicos.

Las paCDs han mostrado la capacidad de promover la internalización de ADN en una variedad de líneas celulares mediante endocitosis.<sup>30</sup> El refinamiento de esta estrategia ha permitido dirigir la transfección a células específicas<sup>31,29f</sup> incluso a producir niveles de expresión de genes terapéuticos relevantes en vivo.<sup>32</sup> El cuerpo de conocimiento generado indica que el balance estructural entre los dominios catiónicos e hidrófobos resulta crítico, probablemente porque de eso dependa combinar las virtudes de polímeros y lípidos catiónicos. Una

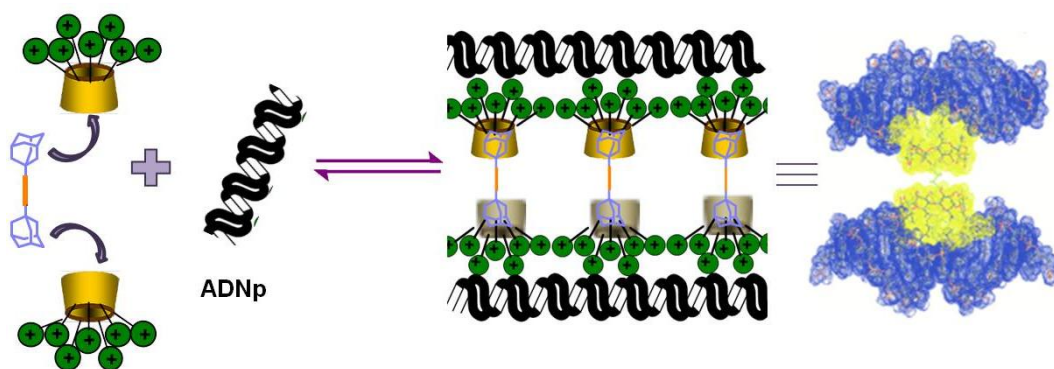
conclusión general en cuanto a la relación estructura-actividad es que solamente las paCDs que son capaces de alinearse alrededor del ácido nucleico en forma de bicapas son capaces de producir CDplejos con capacidad de transfección (Figura 5.5.).<sup>23</sup>



**Figura 5.5.** Representación esquemática de la complejación de ácidos nucleicos por paCDs (izquierda) y micrografía de transmisión electrónica de los CDplejos resultantes (derecha) (R: grupo lipófilo). La estructura fina se la imagen TEM es compatible con la alternancia de dobles hélices de ADN y bicapas de paCDs.

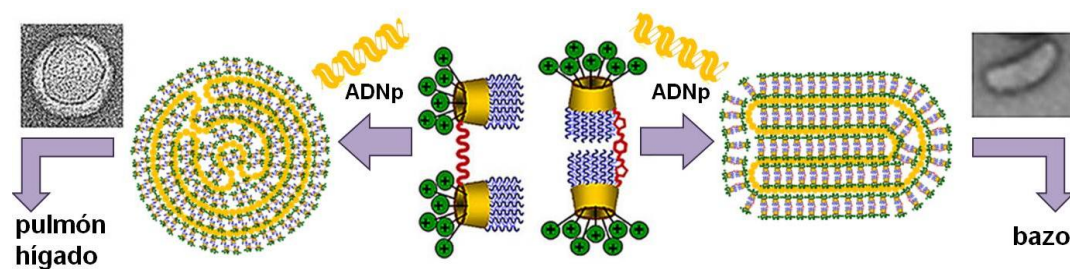
Trabajos anteriores del equipo de investigación han puesto de manifiesto que esta forma de alineamiento, aun promoviéndose a través de mecanismos alternativos, sigue siendo una de las claves para promover la capacidad de transfección de los CDplejos resultantes. Así, la preorganización de ciclodextrinas catiónicas (pCDs) en forma de dímeros haciendo uso de la capacidad de inclusión molecular de las CDs utilizando huéspedes ditópicos con alta afinidad por su cavidad puede lograr un ordenamiento similar, en forma de bicapa, en el que los dominios catiónicos de las CDs queden alineados en sentidos opuestos. La formulación de CDs policationicas, ADNp y derivados diméricos de adamantano producen CDplejos compactos, que protegen el material génico y promueven su internalización celular y expresión, mientras que

la misma formulación en ausencia del dímero de adamantano no produce nanopartículas funcionales.<sup>33</sup> Esta estrategia reduce significativamente el coste sintético manteniendo una flexibilidad que permitiría la optimización de la formulación. Además, debido a la repulsión electrostática entre los clústeres catiónicos, la estabilidad del trímero y del CDplejo depende en gran medida de su grado de protonación, permitiendo actuar sobre el proceso de ensamblaje y desensamblaje a través del control del pH. Así, la disminución del pH que ocurre durante la internalización celular mediante endocitosis conduce a un aumento del grado de protonación y, consecuentemente, a una desestabilización del agregado que facilita la liberación y expresión de ADN (Figura 5.6.).



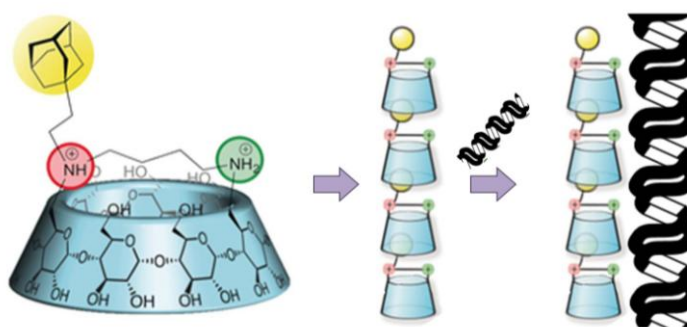
**Figura 5.6.** Interacción de un dímero supramolecular de ciclodextrina policationica-adamantano con ADNp.

Una contribución reciente que estudió una serie de dímeros covalentes de CDs catiónicas ha mostrado que es posible controlar la morfología de los CDplejos en función de cómo se promueva la alineación de las CDs alrededor del molde de ADNp, en forma de quelato o entrecruzado (Figura 5.7.), y que la capacidad de transfección está influenciada por los cambios de morfología.<sup>34</sup>



**Figura 5.7.** Forma y órgano diana de CDplejos formulados con dímeros covalentes de paCDs unidos por la cara primaria (izquierda) o secundaria (derecha).

En otro sentido, Sollogoub y colaboradores han demostrado que derivados catiónicos de CD con tapadera selectivamente funcionalizada con un sustituyente hidrofóbico (adamantano) tienden a ordenarse en torno a moldes polianiónicos como ácidos nucleicos resultando en nano-agregados compactos capaces de promover la transfección celular del material génico (Figura 5.8.). Esta capacidad de autoorganización está condicionada a que no sea posible la autoinclusión de huésped hidrofóbico y es enteramente reversible al añadir moléculas de huésped (adamantano) a la disolución.<sup>35</sup>



**Figura 5.8.** Polimerización supramolecular del derivado de βCD con tapadera de adamantano y co-ensamblaje de ácidos nucleicos.

Estos trabajos ilustran que modificaciones sutiles sobre la estructura tiene enormes consecuencias sobre las propiedades supramoleculares de sistemas autoensamblados. Al mismo tiempo, orientan sobre cómo se podrían implementar estas herramientas para promover patrones de interacción concretos.

El propósito de este capítulo es tratar de implementar las herramientas de control y manipulación de las propiedades de inclusión y dimerización desarrolladas en los capítulos anteriores de esta Tesis al diseño de sistemas autoensamblables en presencia de ácidos nucleicos que puedan ser empleados como vectores moleculares en terapia génica. Un trabajo anterior del equipo de investigación puso de manifiesto cómo la incorporación de elementos aromáticos con movilidad restringida a la cara secundaria de pCDs promueven su alineación en bicapas alrededor de la cadena oligonucleotídica basándose en su tendencia a formar dímeros supramoleculares.<sup>36</sup> Derivados policatiónicos de CD funcionalizados en su cara secundaria con un puente de *o*-xilileno entre O-2 y O-3 de una misma unidad de glucosa mantienen la capacidad de formar dímeros en disolución característica de los análogos neutros. Pero, este equilibrio está regulado por el pH, desplazándose a especies diméricas a pH neutro y a especies monoméricas a pH ácido. (Esquema 1.5.). Por tanto, a través del pH se puede modular el nivel de preorganización para permitir la formación de CDplejos estables a pH neutro en los que el ADNp está protegido. La acidificación que se produce durante la internalización celular conduce a un debilitamiento del dímero que facilita la disociación de la bicapa y la liberación del ácido nucleico.

El control del equilibrio de dimerización y su sensibilidad al pH son factores que afectan de manera importante a la dinámica del proceso de ensamblaje/desensamblaje de los CDplejos. Sin embargo, la estrategia sintética descrita no permitía explorar de manera exhaustiva la interdependencia entre

capacidad de dimerización, autoensamblaje con ADN y capacidad de transfección.

#### **5.4. Resultados y discusión.**

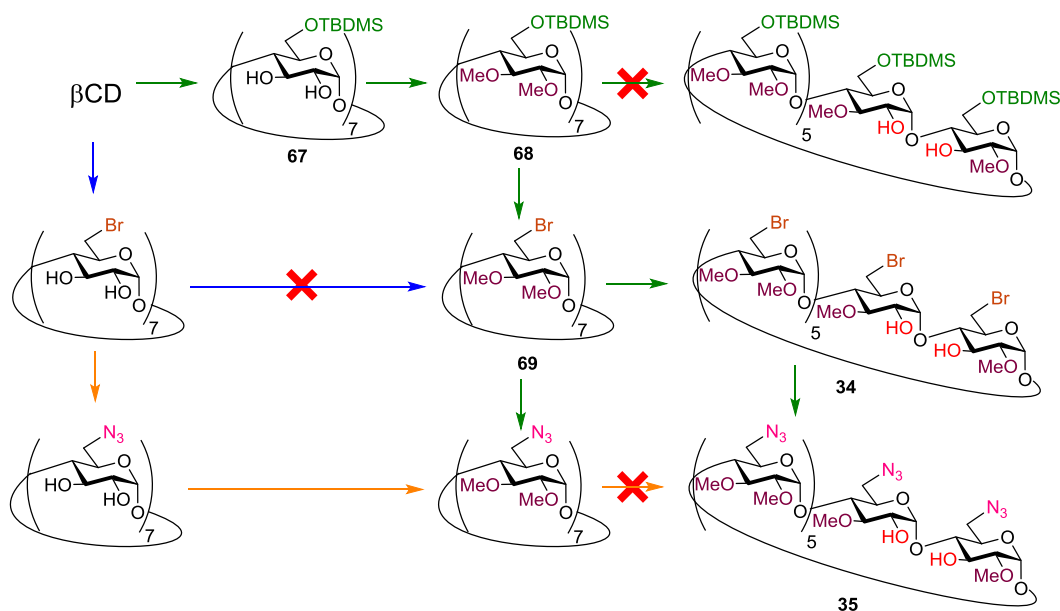
La metodología de síntesis y control de propiedades supramoleculares desarrollada en los capítulos anteriores puede ser una herramienta muy útil para investigar el alcance de este concepto.

Por un lado, la incorporación de grupos aromáticos de distinta geometría en posiciones secundarias de CDs ha demostrado ser una estrategia de modulación de la capacidad de dimerización.<sup>37</sup> Por otro, la estrategia de síntesis debe, en principio, ser compatible con la funcionalización de la cara primaria de la CD con elementos policatiónicos. Sobre esta hipótesis de partida, se ha planteado la combinación de ambas estrategias para la elaboración de una familia de paCDs lo más diversa desde el punto de vista estructural y explorar su capacidad de autoensamblaje y transfección de ADNp.

##### **5.4.1. Síntesis de ciclodextrinas policatiónicas autoensamblables.**

El esquema retrosintético más eficaz para la preparación de derivados de CD catiónicos en su cara primaria y funcionalizados con segmentos aromáticos en la secundaria requiere, como síntesis clave, un derivado con azidas en su cara primaria y dos grupos diferenciados en la secundaria. Los primeros se podrían funcionalizar vía cicloadición dipolar-1,3 catalizada por Cu(I) con alquinos para introducir los elementos catiónicos. Los segundos servirían como sitios de anclaje del elemento aromático con la estrategia desarrollada en los capítulos anteriores. La obtención de **35** requiere de la compatibilización entre

las estrategias de funcionalización facial selectivas que dispongan grupos azida en cara primaria y la de didesmetilación regioselectiva mediada por DIBAL-H descrita por Sinaÿ y Sollogoub.<sup>38</sup>



**Esquema 5.1.** Diseño de la estrategia de síntesis del diol **35**.

Para la preparación del derivado de βCD **35**, selectivamente desprotegido en las posiciones secundarias O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup> y perfuncionalizado en la cara primaria con grupos azida se han considerado dos estrategias alternativas. Una primera estrategia ha consistido en la funcionalización regioselectiva de los hidroxilos primarios mediante bromación siguiendo el procedimiento descrito por Defaye y Gadelle,<sup>39</sup> seguida de metilación de los hidroxilos secundarios empleando MeI e NaH, y posterior sustitución nucleofílica del haluro por azida. Desafortunadamente, la presencia de los haluros en las posiciones primarias es incompatible con las condiciones de alquilación (Esquema 5.1., flechas azules).



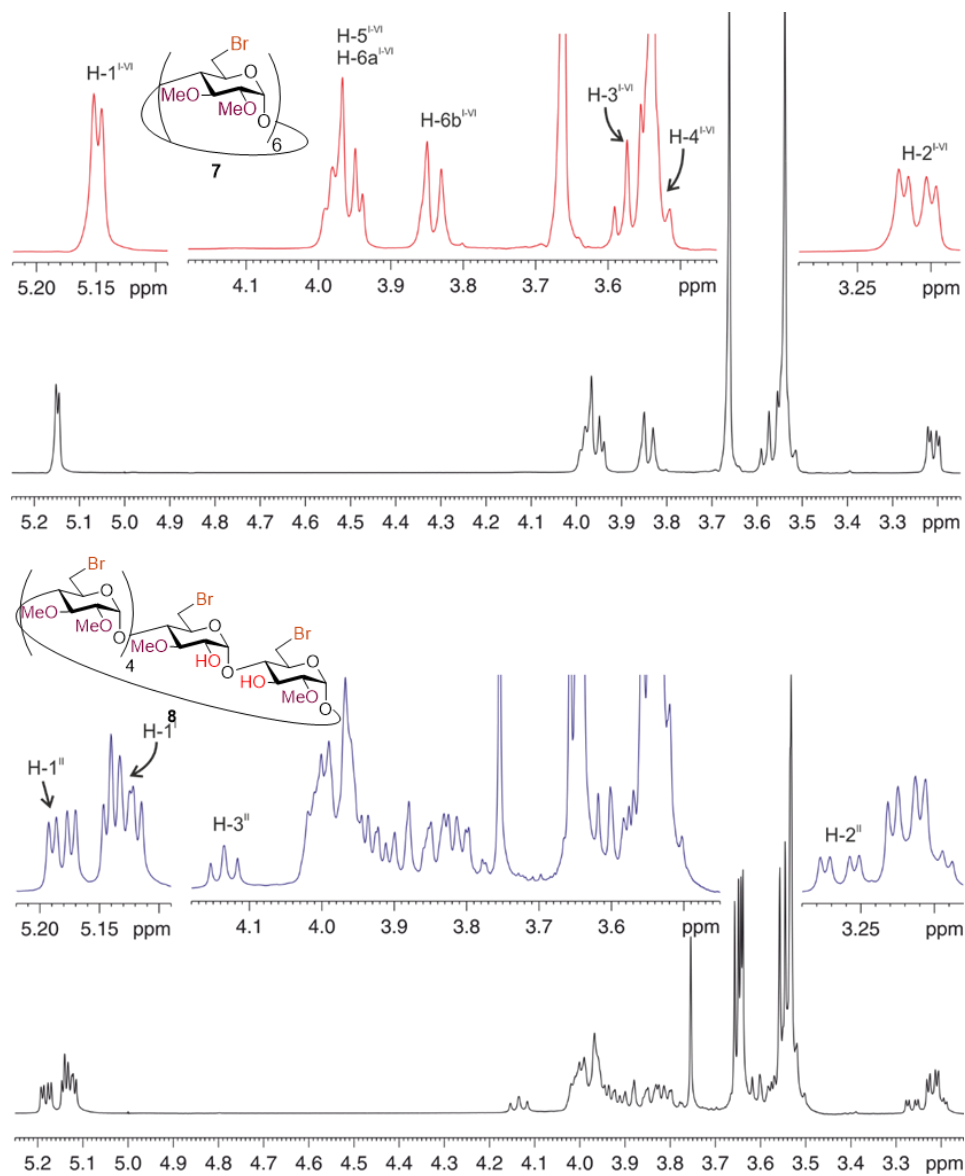
Una segunda alternativa consideró llevar a cabo la sustitución nucleofílica de los átomos de bromo por grupos azida y, a continuación, la reacción de alquilación. Pero el grupo azida no es estable en las condiciones de desmetilación reductiva con DIBAL-H (Esquema 5.1. flechas naranjas).

La síntesis se abordó, finalmente, siguiendo una ruta que implica la protección regioselectiva de los hidroxilos primarios mediante sililación con cloruro de *terc*-butildimetilsililo, siguiendo el procedimiento descrito por Takeo<sup>40</sup> ( $\rightarrow$  **67**), seguido de metilación de los hidroxilos secundarios por tratamiento con yoduro de metilo en presencia de hidruro sódico ( $\rightarrow$  **68**)<sup>40</sup> (Esquema 5.1. flechas verdes). La presencia de los silil-éteres no permitió la di-desmetilación regioselectiva con DIBAL-H<sup>41</sup> pero si su sustitución directa por bromo ( $\rightarrow$  **69**) siguiendo el método descrito por Stoddart.<sup>42</sup> Esta estrategia permitió obtener el derivado **69** con un 68% de rendimiento.

Puesto que los grupos azida son sensibles al agente reductor DIBAL-H, se decidió proceder en primer lugar a la di-desmetilación regioselectiva de las posiciones secundarias O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup> ( $\rightarrow$  **34**). La reacción se llevó a cabo en tolueno empleando 9 equivalentes de DIBAL-H (Esquema 5.2.) y requirió una purificación mediante columna cromatográfica, aislándose el derivado de  $\beta$ CD (**34**) con rendimiento del 45%.

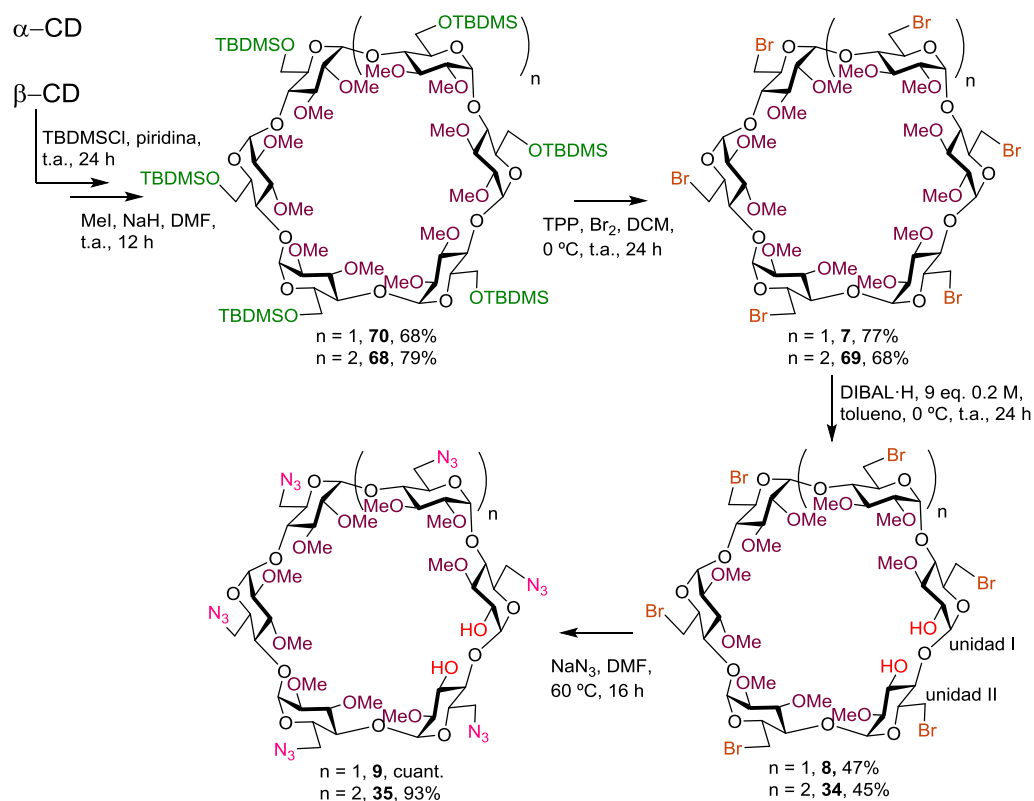
Experimentos anteriores de desmetilación regioselectiva de la  $\alpha$ CD per-O-metilada no permitieron aislar de manera eficaz el producto 2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-didesmetilado debido a la compleja mezcla de regioisómeros formados. Sin embargo, en el caso del derivado **7**, obtenido a partir de  $\alpha$ CD siguiendo una estrategia similar a la empleada para la obtención de **69** (Esquema 5.2.), el tratamiento con DIBAL-H produjo selectivamente el diol **8** con 47% de rendimiento. La ausencia de metoxilos en la cara primaria aumenta la selectividad de la reacción de reducción hacia las posiciones O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup>. Las estructuras de los compuestos preparados se confirmaron mediante

espectrometría de masas y espectroscopía de RMN, observándose en los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de **8** y **34** la esperable pérdida de simetría estructural respecto a los derivados homogéneamente sustituidos **7** y **69** (Figura 5.9.).



**Figura 5.9.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de **7** (arriba) y **8** (abajo) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

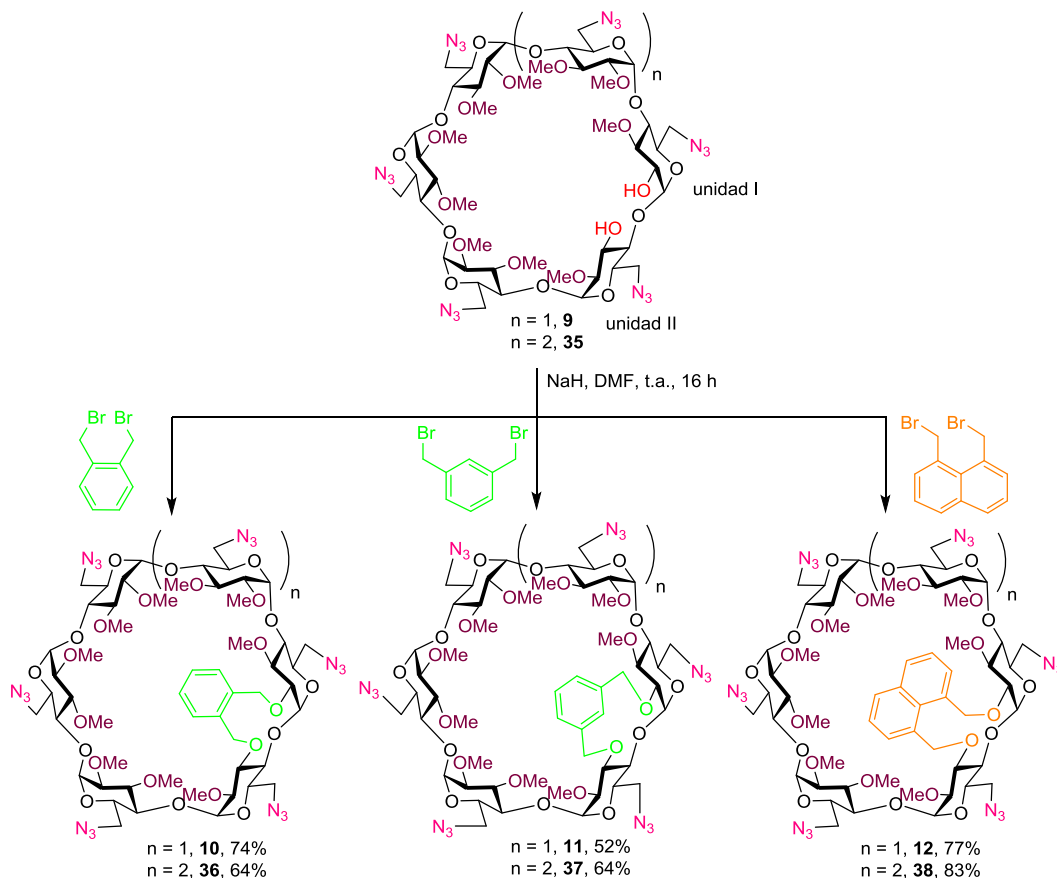
La sustitución nucleofílica de los átomos de bromo por grupos azida ( $\rightarrow$  **9** y **35**) se llevó a cabo utilizando  $\text{NaN}_3$ , en DMF a 60 °C de manera cuantitativa, sin ser necesaria la purificación posterior (Esquema 5.2.).



**Esquema 5.2.** Síntesis de los derivados **9** y **35**.

La incorporación de los segmentos aromáticos (*o*- y *m*-xilileno y 1,8-dimetilnaftileno) en la cara secundaria se llevó a cabo empleando las condiciones descritas en los Capítulos 3 y 4 de esta Tesis, utilizando como reactivo el dibromo derivado correspondiente en presencia de hidruro sódico en DMF (Esquema 5.3.). De este modo se aislaron los derivados de αCD **10-12** (52-77%) y los derivados de βCD **36-38** (64-83%) funcionalizados con anillos

aromáticos en la cara secundaria y perfuncionalizados con grupos azida en la cara primaria.



**Esquema 5.3.** Síntesis de los derivados **10**, **36**, **11**, **37**, **12**, **38**.

La eficacia de la reacción de macrociclación se ilustra en la Figura 5.10. en la que se representa el espectro de ESI del crudo de la reacción de **9** para dar **12** y en el que se observa un único pico correspondiente a la sal sódica del producto deseado.

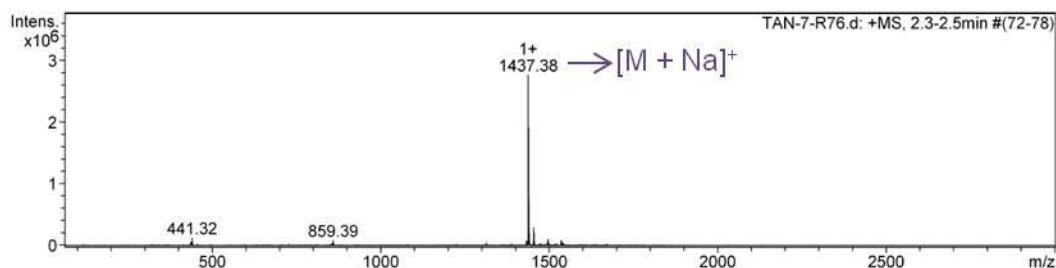
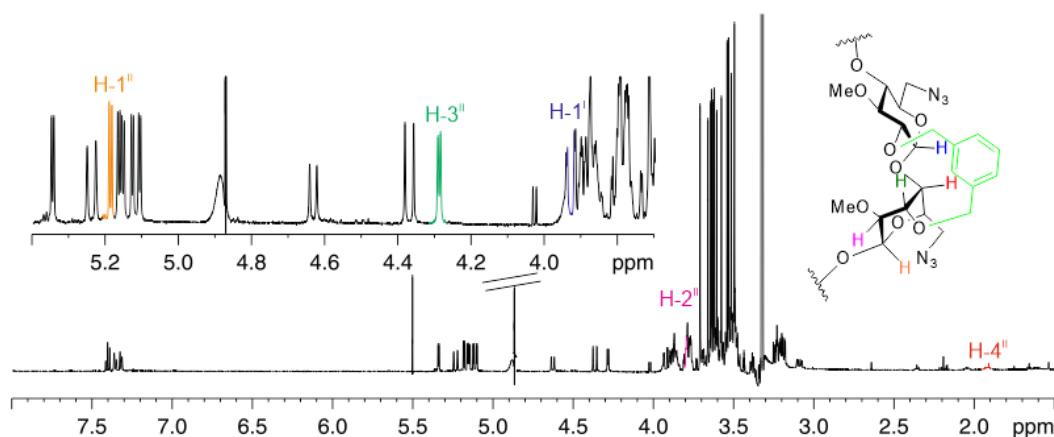


Figura 5.10. Espectro de masas ESI del crudo de reacción de **12**.

Un estudio comparativo de espectros de RMN de los derivados *o*- (**10** y **36**) y *m*-xililenados (**11** y **37**) demuestra que las restricciones conformacionales impuestas por el segmento aromático reproducen lo observado para los compuestos **1** y **2** descritos en el Capítulo 3. Los derivados *o*-xililenados **10** y **36** preservan la forma troncocónica de la ciclodextrina, con todas las unidades de glucosa en conformación  ${}^4C_1$ , independientemente del tamaño del ciclooligosacárido ( $\alpha$ - o  $\beta$ CD). Por el contrario, los derivados *m*-xililenados **11** y **37** sufren la alteración conformacional de una de sus unidades de glucosa (unidad II, sustituida en O-3) que se traduce en deformación de la cavidad.

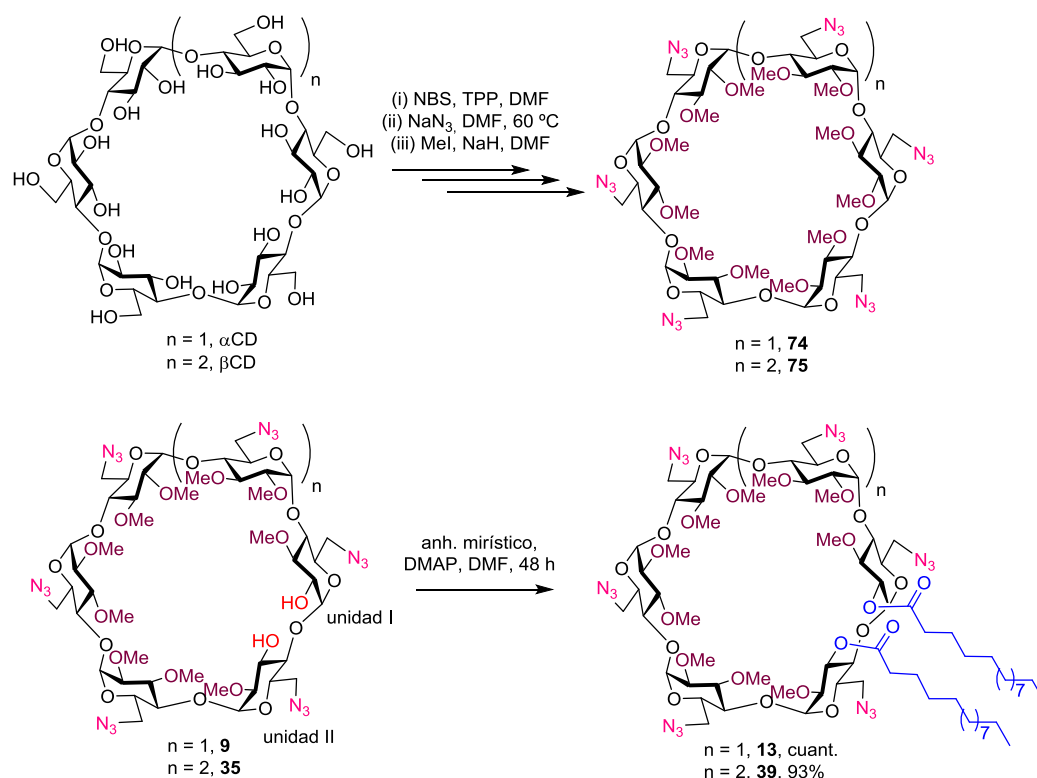
Los espectros de  ${}^1H$  RMN, TOCSY y 2D COSY de los derivados de  $\alpha$ CD y  $\beta$ CD funcionalizados con *m*-xilileno (**11** y **37**) muestran señales análogas a las del derivado de  $\beta$ CD **2**, discutidas en el Capítulo 3. La subunidad II presenta dos sistemas de espín, uno que corresponde a los protones H-1, H-2 y H-3 y otro que incluye H-4, H-5 y H-6. El apantallamiento de H-4<sup>II</sup> y el doblete correspondiente a H-3<sup>II</sup> desplazado a campo bajo indica un cambio en la silla de la unidad de glucopiranososa II que adopta una conformación  ${}^4C_1$  (Figura 5.11.). Este cambio conformacional induce una deformación de la cavidad de la CD que adquiere una forma ovoide. En contraste, el segmento de *o*-xilileno permite su unión a las posiciones O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup> sin imponer tensión, confirmando los espectros de  ${}^1H$  RMN de los compuestos **10** y **36** que las unidades de glucosa presentan

conformación  ${}^1C_4$ , manteniendo la forma característica toroidal de la cavidad. Los espectros de  ${}^1H$  RMN de los derivados de naftaleno (**12** y **38**) también muestran analogía con los de su análogo **3**.



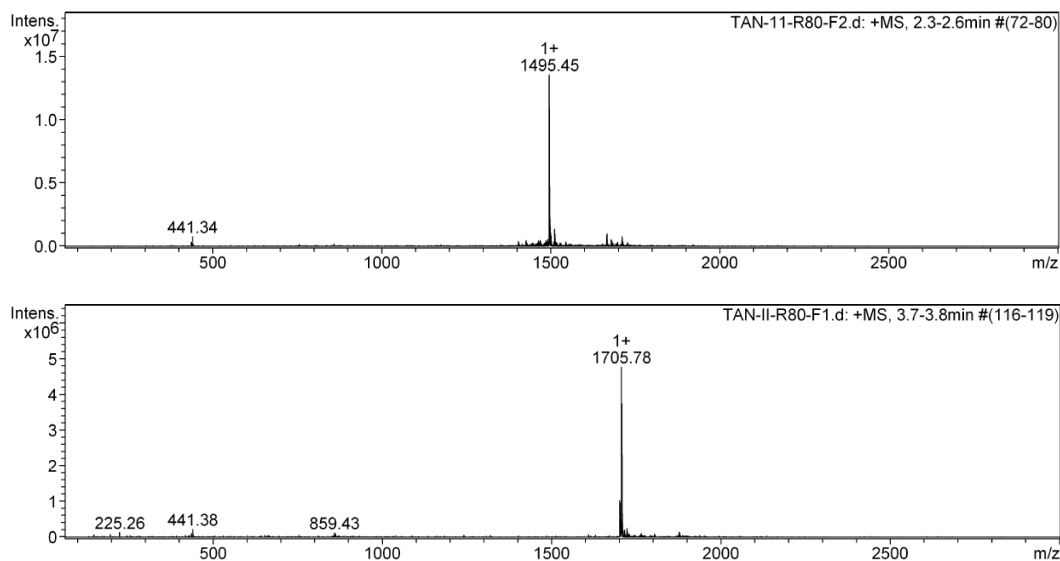
**Figura 5.11.** Espectro de  ${}^1H$  RMN de **37** (600 MHz, MeOD).

Con objeto de determinar la influencia de los anillos aromáticos en el proceso de autoensamblaje y compararlo con el de ciclodextrinas anfífilas faciales convencionales, se han preparado, por un lado, los derivados desprovistos de segmento aromático, completamente metilados en su cara secundaria, y, por otro, los derivados funcionalizados con cadenas grasas en las posiciones O-2<sup>I</sup> y O-3<sup>II</sup>. La elaboración de los primeros se ha realizado a partir de las correspondientes per-6-azido-2,3-dimetil- $\alpha$ - y  $\beta$ CDs (**74** y **75**, respectivamente). Ambos compuestos están descritos en la literatura y son fácilmente accesibles a partir de las ciclodextrinas naturales a través de una secuencia de tres etapas: (i) halogenación regioselectiva de los hidroxilos primarios con *N*-bromosuccinimida, sustitución nucleofílica del haluro por azida y metilación exhaustiva de los hidroxilos de la cara secundaria (Esquema 5.4.).<sup>29b,43</sup>



**Esquema 5.4.** Síntesis de los derivados **74**, **75**, **13** y **39**.

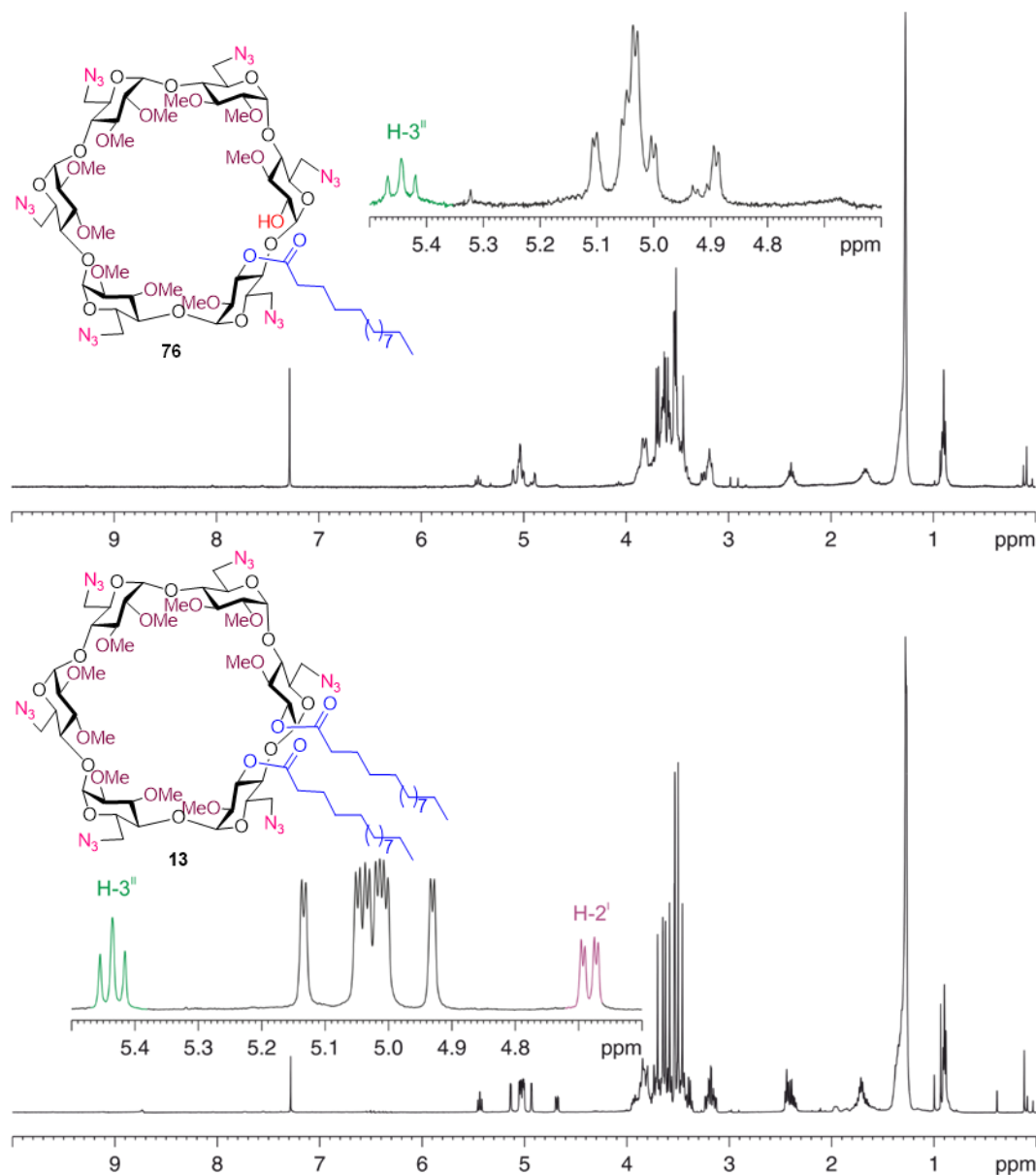
La elaboración de los segundos se ha realizado a partir de los dioles **9** y **35**, por esterificación con anhídrido mirístico y 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) en DMF (Esquema 5.4.). A pesar que la reacción transcurre con rendimientos casi cuantitativos, el seguimiento mediante cromatografía en capa fina permitió observar la formación inicial de un producto monoacilado, tal y como confirman el espectro de masas (**76**,  $m/z$  1495.5  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , Figura 5.12.) y el espectro de  $^1\text{H}$  RMN, en el que se observó un triplete a 5.45 ppm asignable al protón H-3<sup>II</sup> (Figura 5.13.).



**Figura 5.12.** Espectros de masas ESI de **76** (arriba) y **13** (abajo).

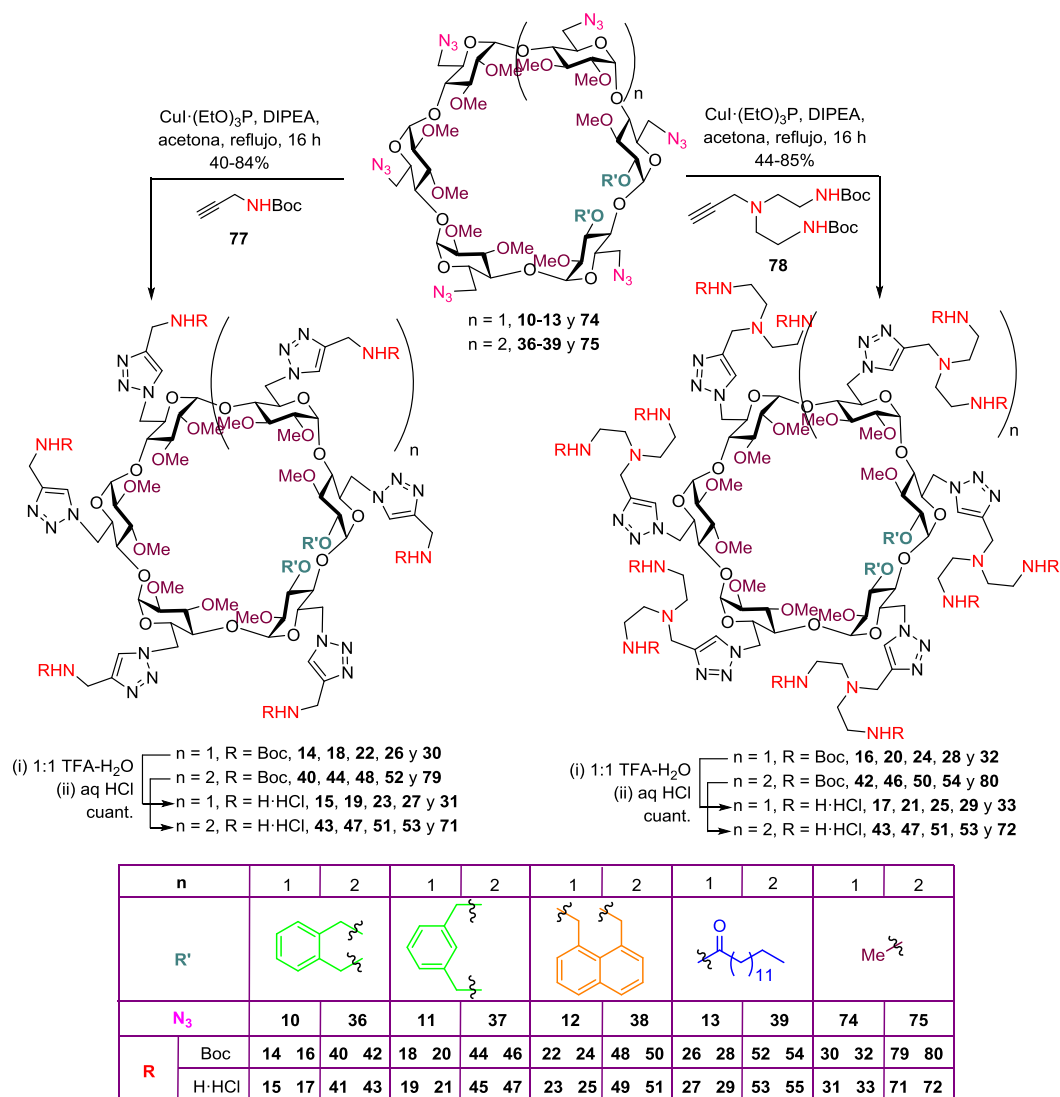
El aumento del tiempo o la temperatura de reacción dan lugar a la aparición de un segundo producto, de  $R_f$  superior, que se corresponde con producto diacilado **13**, como indicó la espectrometría de masas ( $m/z$  1705.8 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>, Figura 5.12.) y la espectroscopía de <sup>1</sup>H RMN, que muestra una señal con multiplicidad de doble doblete en torno a 4.7 ppm correspondiente al protón H-2<sup>I</sup> (Figura 5.13.). Por tanto, las reacciones de acilación transcurren de forma regioselectiva, acilándose en primer lugar la posición O-3<sup>II</sup>.





**Figura 5.13.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN de los productos parcial (**76**, arriba) y doblemente miristoilado (**13**, abajo) (400 MHz y 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , respectivamente).

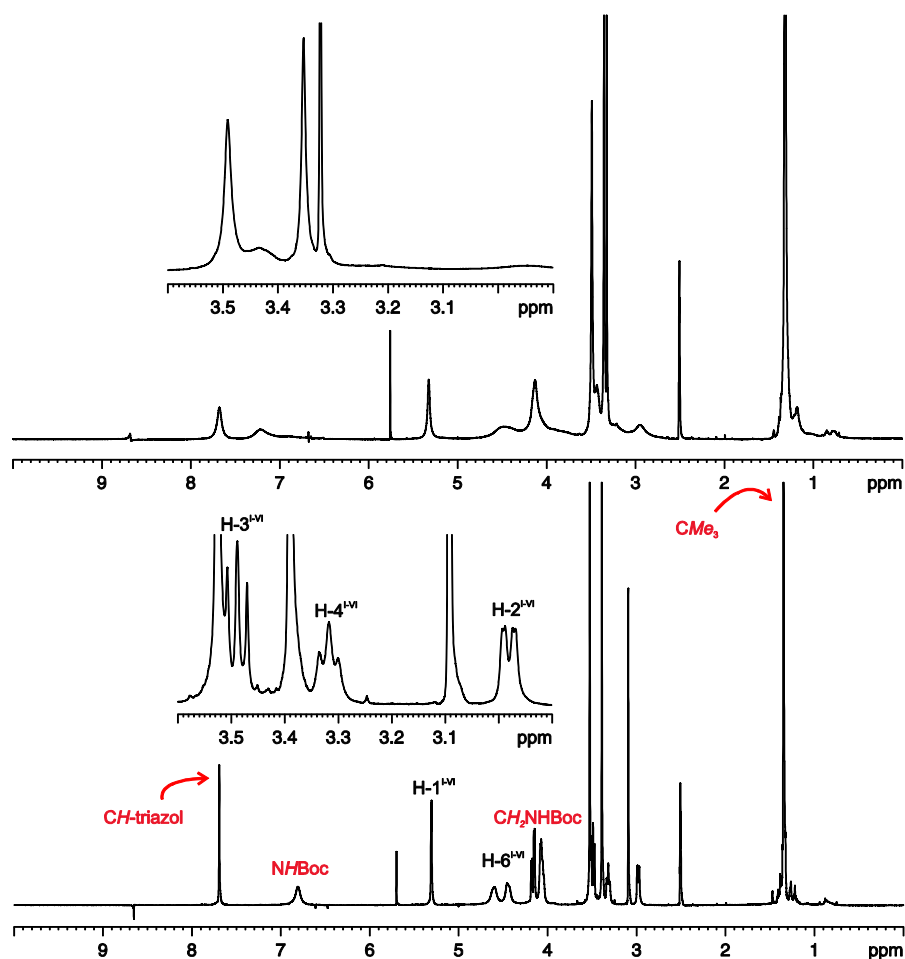
Con el fin de introducir los elementos catiónicos, los derivados poliazidados de  $\alpha$ - (**10-13** y **74**) y  $\beta$ CD (**36-39** y **75**) descritos anteriormente se acoplaron a alquinos funcionalizados con grupos aminos convenientemente protegidos a través de reacciones de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada por cobre (I) (*Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC).<sup>44</sup> Para ello fueron empleados *N*-*tert*-butoxicarbonilpropargilamina (**77**) y *N,N*-bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]-propargilamina (**78**),<sup>29a</sup> dos alquinos fácilmente asequibles que permiten modular de forma flexible la densidad catiónica en la cara primaria de las CDs. Las reacciones de multiconjugación se realizaron en acetona a reflujo, en presencia de DIPEA y catalizadas por el complejo yoduro de cobre-trietilfosfito ( $\text{CuI} \cdot \text{P}(\text{EtO})_3$ ),<sup>45</sup> que resulta muy eficaz para catalizar estas reacciones en medio orgánico. Las condiciones han podido ser optimizadas disminuyendo la cantidad de catalizador hasta 0.01 equivalentes, lo cual minimiza el riesgo de contaminación de los productos finales con sales de cobre. La purificación de los productos de conjugación se realizó en todos los casos mediante columna cromatográfica, aislándose los correspondientes compuestos rendimientos entre el 40-85% (Esquema 5.5.).



**Esquema 5.5.** Esquema de síntesis de la colección de ciclodextrinas catiónicas mediante cicloadición dipolar-1,3 de azidas y alquinos.

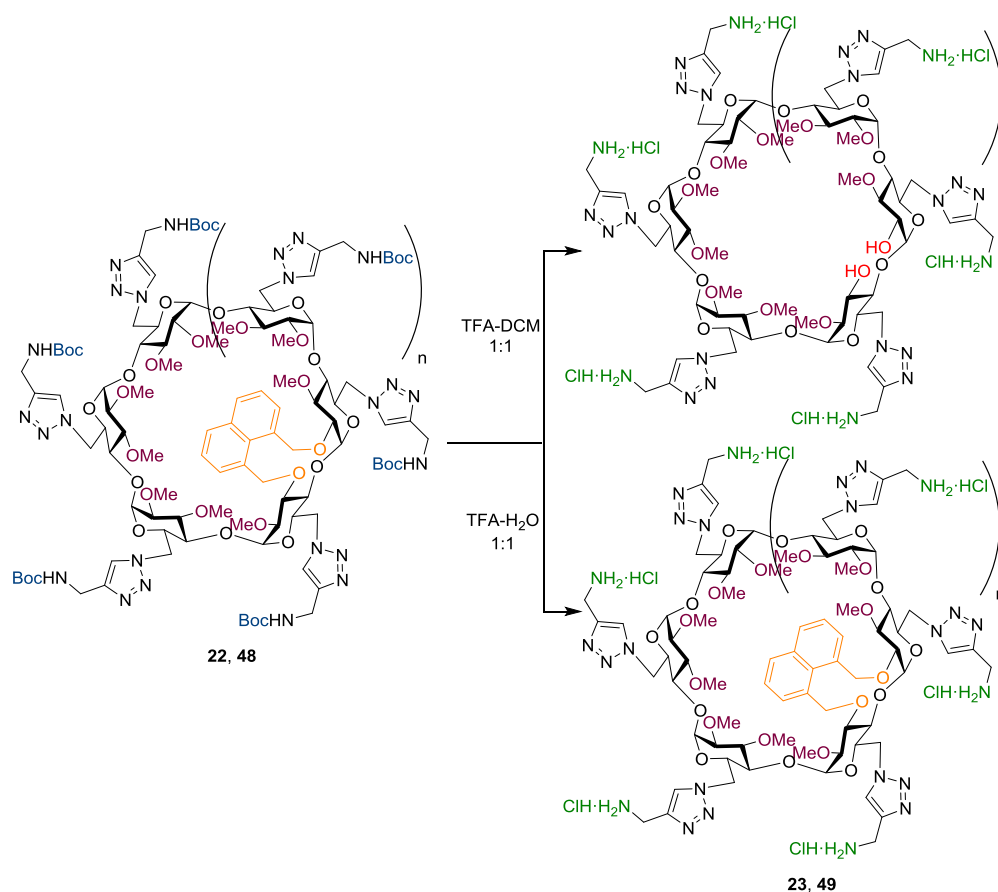
La estructura de todos los compuestos preparados se confirmó mediante los espectros MS-ESI, RMN y análisis elemental. Los espectros de RMN a temperatura ambiente de los conjugados protegidos mostraron, en general,

señales anchas asociadas a la rotación restringida de los enlaces de los grupos *tert*-butil carbamato, incluso en el caso de los derivados de control simétricos sin anillo aromático (**30** y **32**).<sup>46</sup> A temperaturas más altas (323 o 343 K) la resolución espectral mejoró considerablemente (Figura 5.14.)



**Figura 5.14.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN de **30** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) a 298 K (arriba) y 343 K (abajo).

La desprotección de los grupos carbamato se llevó a cabo mediante hidrólisis ácida. Las condiciones convencionales de TFA en disolvente aprótico (DCM) resultaron eficaces para la desprotección en el caso de los derivados xililenados y miristoilados.<sup>23</sup> Sin embargo, estas condiciones condujeron en el caso de los derivados de naftaleno, a la rotura de los éteres bencílicos y a la consiguiente pérdida del segmento aromático además de los carbamatos de terc-butilo (Esquema 5.6.).



**Esquema 5.6.** Hidrólisis de los grupos carbamato empleando una mezcla 1:1 TFA-DCM o TFA-H<sub>2</sub>O.

Esta reacción no está descrita en la bibliografía. De hecho los éteres de 2-metilnaftilo son razonablemente estables a condiciones ácidas de desprotección y está descrita su compatibilidad con la hidrólisis de grupos isopropileno y *p*-metoxibenzoílo.<sup>47</sup> En este caso, la mayor riqueza electrónica del segmento 1,8-dimetilnaftaleno debe aumentar su sensibilidad en estas condiciones, asemejándola a la del grupo *p*-metoxibenzoílo. Afortunadamente, la simple modulación de la acidez del promotor ácido resultó suficiente para evitar la hidrólisis del segmento aromático. Realizando la desprotección en una mezcla 1:1 de TFA-H<sub>2</sub>O se consiguió obtener la hidrólisis cuantitativa de los carbamatos sin afectar al puente de naftaleno (Esquema 5.6.).

Los derivados finales se aislaron en forma de los correspondientes hidrocloruros tras liofilización repetida con una disolución de HCl diluido. Se ha preparado así una familia de derivados policatiónicos de  $\alpha$ - y  $\beta$ CD con diferente densidad de carga en la cara primaria y con la cara secundaria funcionalizada con clips de *o*-xilileno (**15**, **17**, **41**, **43**), *m*-xilileno (**19**, **21**, **45**, **47**) o 1,8-dimetilnaftileno (**23**, **25**, **49**, **51**), y derivados completamente metilados en su cara secundaria (**31**, **33**, **71**, **72**) o con dos cadenas de miristoílo (**27**, **29**, **53**, **55**) como los compuestos control (ver ficha anexa).

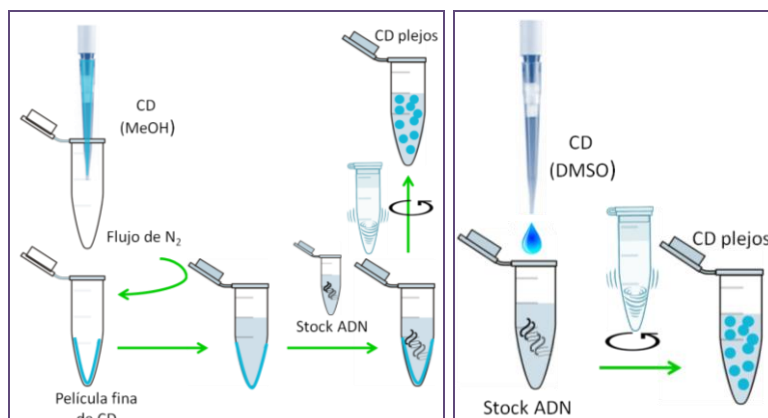
#### **5.4.2. Estudios de interacción con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y dispersión dinámica de la luz (DLS).**

Para determinar el tamaño y la distribución de los complejos se empleó la medida de la dispersión dinámica de la luz (DLS). Esta técnica permite, a partir del análisis de la luz dispersada por la muestra cuando es irradiada con luz láser, determinar el diámetro hidrodinámico y, a través del análisis estadístico de la distribución de tamaños de partícula, el cálculo del índice de polidispersidad (IP).

Adicionalmente, se ha medido el potencial electrostático (potencial  $\zeta$ ) de la superficie de las nanopartículas formadas mediante el análisis de Fase por Medida en Modo Mixto de la Dispersión de la Luz (*Mixed Mode Measurement-Phase Analysts Light Scattering*, M3-PALS).

Los ensayos preliminares de complejación CD-ADN se realizaron empleando un ácido nucleico modelo comercial como el ADN de timo de ternera (*calf thymus DNA*, abreviado como *ctADN* en esta Tesis). El *ctADN* es un ácido nucleico de doble hebra altamente polimerizado (10-15 millones de Da), que, si bien no tiene una estructura similar a la del ADN plasmídico, suele ser un modelo económico para estudios preliminares.

En un primer lugar se comprobó que las disoluciones de ácido nucleico o las CDs catiónicas por separado no formaban agregados ordenados por sí solos. El proceso de autoensamblaje requiere que ambos ejerzan como molde o plantilla de ordenamiento, en el que el procedimiento de formulación juega un papel muy relevante. Así, se han explorado dos técnicas de formulación de complejos CD-ADN: el método de la nanoprecipitación<sup>48</sup> y el de la película fina<sup>49</sup> (Figura 5.15.). En el primero consiste en la dilución de una disolución concentrada en disolvente orgánico miscible con el agua del agente complejante, el derivado de CD policationico en este caso, en una disolución del ácido nucleico. Se pretende así que las moléculas del agente de complejación interaccionen individualmente con el ácido nucleico en un primer estadio y que esa interacción inicial promueva el ensamblaje.



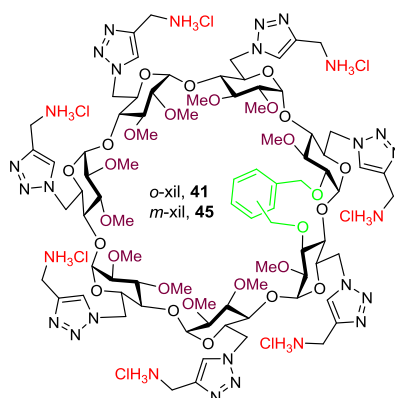
**Figura 5.15.** Representación esquemática de los procedimientos de formulación de CDplejos explorados: nanoprecipitación (izquierda) y película fina (derecha).

En el método de la película fina se pretende que sean agregados preformados del agente de complejación los que interaccionen con el ácido nucleico. Para ello, en un primer paso, se forma una capa fina del agente de complejación por evaporación lenta de una disolución del mismo en un disolvente volátil. Una vez formada, se rehidrata la película con el medio acuoso para resuspenderlo, lo cual, en función de la solubilidad del agente, puede ocurrir en forma de agregados con los cuales el ácido nucleico que se añade en la última etapa tiene la oportunidad de interaccionar.

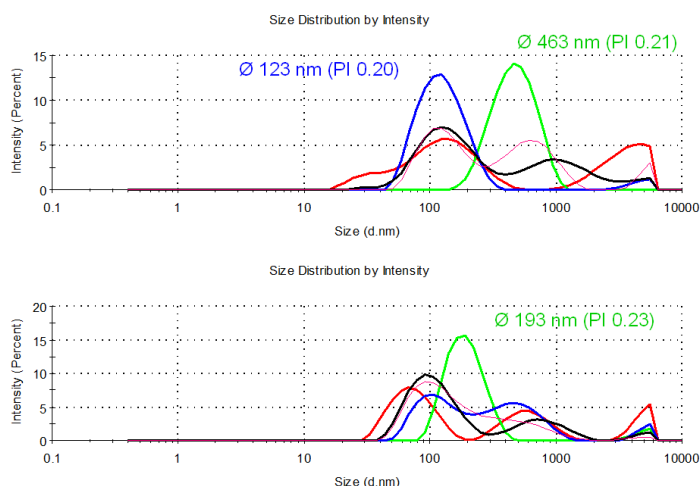
El funcionamiento de ambos métodos se comparó en ensayos preliminares con los derivados de  $\beta$ CD de baja densidad catiónica  $\alpha$ - (**41**) y  $m$ -xililenados (**45**) (Figura 5.16.). Se formularon complejos manteniendo constante la concentración de ADN y modificando la proporción de CD en el rango de relación N/P 1-10, siendo ésta la relación entre el número de grupos anionizables en el ADN (fosfatos) y el de grupos cationizables de la CD (aminas). La formulación de estos complejos en agua por el método de nanoprecipitación, disolviendo los derivados **41** y **45** en DMSO, dio lugar a dispersiones coloidales



de tamaño de partícula no solo dependiente de la relación N/P sino de la estructura molecular de la CD (Figura 5.17.). Mientras que el derivado *o*-xililenado **41**, con mayor tendencia a formar dímeros, consigue compactar el ADN en nanopartículas homogéneas desde relaciones N/P muy bajas (N/P 1, Ø 123 nm, IP 0.20), el derivado *m*-xililenado **45** requiere concentraciones más altas para producir agregados similares (N/P 2, Ø 193 nm, IP 0.21). En ambos casos la influencia de la relación N/P es crítica para la homogeneidad de los agregados: relaciones más bajas probablemente dan lugar a una compactación ineficaz del ácido nucleico, mientras que relaciones más altas tienden a producir partículas de mayor tamaño y dispersión (p. e. Ø 463 nm y IP 0.21, para **41**:ctADN a N/P 2).



**Figura 5.16.** Estructura de los derivados de  $\beta$ CD de baja densidad catiónica *o*- (**41**) y *m*-xililenados (**45**).

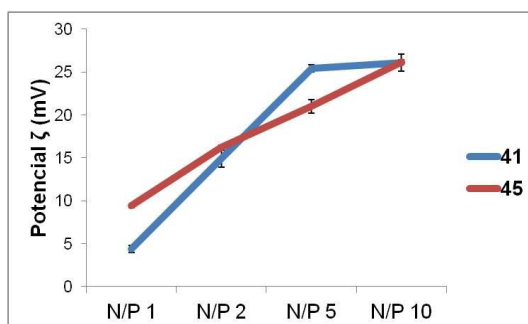


**Figura 5.17.** Tamaño y distribución de tamaño de las partículas en agua que forman los derivados solos (línea roja) y de los CDplejos a relación N/P 1 (línea azul), 2 (línea verde), 5 (línea negra) y 10 (línea rosa) de **41** (arriba) y **45** (abajo).

El método de formulación de película fina resultó sistemáticamente en agregados de tamaño mucho mayor independientemente del segmento aromático (*o*- o *m*-xilileno), el tamaño la CD ( $\alpha$ - o  $\beta$ CD) y relación N/P (1-10). En la mayoría de los experimentos se obtuvieron agregados de tamaño superior a 2  $\mu$ m, por lo que se ha empleado en adelante el método de nanoprecipitación.

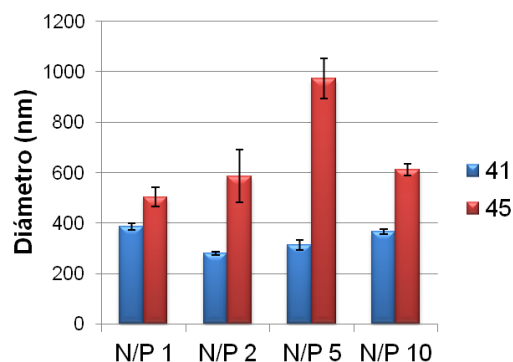
Las medidas de potencial  $\zeta$  de los CDplejos formulados a través del método de nanoprecipitación con los derivados de  $\beta$ CD de baja densidad catiónica *o*- (**41**) y *m*-xililenados (**45**) siguen la pauta que cabría esperar para un modo de condensación en el que las moléculas de CD van organizándose alrededor del ADN como un si fuera un molde. En las formulaciones en que se detectan partículas definidas el potencial es positivo y aumenta en el mismo sentido que la relación N/P (Figura 5.18.). La dependencia entre potencial y relación N/P también parece depender de la estructura, pero en cualquiera de las formulaciones estudiadas, los valores se encuentran en el rango de utilidad

de transfección: valores moderadamente positivos que permitan la interacción electrostática con los proteoglicanos de la superficie celular y que no induzcan alteraciones en la membrana.



**Figura 5.18.** Potencial  $\zeta$  (mV) de los CDplejos formulados con los derivados de  $\beta$ CD de baja densidad catiónica *o*- (**41**) y *m*-xililenados (**45**) y ctDNA en agua a distintos N/P.

Adicionalmente, se han estudiado las propiedades de los CDplejos formulados en un medio tamponado (10 mM, HEPES pH 7.4). Un medio tamponado puede influir en las propiedades de los CDplejos en la medida en que condiciona las interacciones electrostáticas de las que depende el proceso de coensamblaje CD-ADN. Estas condiciones de formación de CDplejos son más exigentes y requieren relaciones N/P más altas para producir un grado de compactación similar. Así, las formulaciones con el derivado *o*-xililenado **41** resultaron en CDplejos sistemáticamente más grandes y polidispersos que los obtenidos en agua (Figura 5.19.). Aun así, es posible alcanzar tamaños y dispersiones razonables con formulaciones a N/P 2 ( $\varnothing$  278 nm, IP 0.43) y 5 ( $\varnothing$  313 nm, IP 0.44). Por el contrario, el derivado **45** no es capaz de producir agregados homogéneos a ningún N/P en HEPES, lo cual puede atribuirse a la limitada capacidad para dimerizar de la plataforma de  $\beta$ CD *m*-xililenada.



**Figura 5.19.** Diámetro hidrodinámico de los CDplejos formulados con *ctADN* y los derivados de  $\beta$ CD  $\alpha$ - (**41**) y *m*-xililenado (**45**) a distinto N/P en HEPES.

Curiosamente, los derivados de  $\alpha$ CD  $\alpha$ - (**15**) y *m*-xililenados (**19**), análogos estructurales a **41** y **45**, tampoco producen CDplejos homogéneos en HEPES, confirmando el papel fundamental que pueden llegar a jugar las alteraciones estructurales en principio más sutiles, como son la geometría del elemento aromático o el tamaño del macrociclo de ciclodextrina.

Con el fin de contrastar la relevancia biofísica de estos resultados se ha investigado la complejación de ADN plasmídico. En colaboración con el grupo de la Prof. C. Tros de Ilarduya (Univ. de Navarra), se ha caracterizado la formación de CDplejos por DLS y electroforesis con un plásmido de ADN (ADNp) que codifica la luciferasa (pCMV-SV40-luciferase-SV40pA, 5739 pares de bases). Y de entre los candidatos con propiedades biofísicas más relevantes, se ha hecho una selección para evaluar su eficacia de transfección *in vitro* utilizando células COS-7 y HepG2.

A diferencia del *ctADN*, el ADN plasmídico suele presentar un grado de plegamiento superior que se traduce en una densidad de carga muy inferior a la formal (-2 por par de bases).<sup>50</sup> Como consecuencia, la componente electrostática de la interacción con el vector está atenuada, limitando en ocasiones la capacidad de formación de complejos compactos.

Los experimentos preliminares sobre esta serie de compuestos parecen apuntar en este sentido. En tampón HEPES (11 mM, pH 7.4, glucosilado al 5%), ninguna de las formulaciones de ADNp con derivados de  $\alpha$ - y  $\beta$ CD de baja densidad de carga con clips aromáticos (*o*-xilileno **15** y **17**, *m*-xilileno **19** y **21**, y 1,8-dimetilnaftileno **23** y **25**) produjo CDplejos homogéneos de tamaño nanométrico a ninguna de las relaciones N/P empleadas (hasta N/P 20). En el caso de los derivados con alta densidad de carga, sólo los derivados de  $\beta$ CD *o*-xilileno **43**, *m*-xilileno **47** y 1,8-dimetilnaftileno **51**, con 21 grupos protonables (14 aminas primarias y 7 terciarias), formaron CDplejos homogéneos a N/P 20 (Tabla 5.1.).

**Tabla 5.1.** Diámetros hidrodinámicos (nm), índices de polidispersidad (IP) y potencial  $\zeta$  (mV) para los CDplejos formulados con los derivados de  $\beta$ CD de alta densidad catiónica **43**, **47** y **51** a N/P 20 con ADNp en HEPES glucosilado 5% (11 mM, pH 7.4).

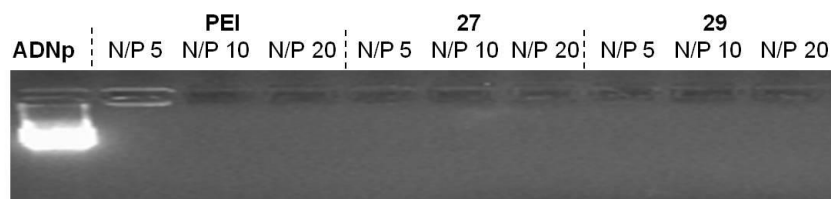
	<b>43</b>	<b>47</b>	<b>51</b>
<b><math>\emptyset</math> (nm)</b>	102 $\pm$ 5	212 $\pm$ 10	101 $\pm$ 8
<b>IP</b>	0.26	0.30	0.24
<b><math>\zeta</math> (mV)</b>	28 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3	29 $\pm$ 4

Los derivados de  $\alpha$ CD funcionalizados con cadenas alifáticas (**27** y **29**), a diferencia de los que poseen clips aromáticos, forman CDplejos con tamaños en torno a 100 nm a todas las relaciones de N/P ensayadas, confirmando el papel determinante del balance de hidrofilia e hidrofobia en el proceso de ensamblaje (Tabla 5.2.). En el caso de los análogos de la serie de  $\beta$ CD (**53** y **55**), los CDplejos más pequeños y homogéneos (111 y 117 nm, respectivamente) corresponden a las formulaciones a relaciones N/P 20. Los valores de potencial  $\zeta$ , obtenidos mediante M3-PALS, fueron positivos en todo el rango de N/P estudiado confirmando la neutralización del ADN.

**Tabla 5.2.** Diámetros hidrodinámicos (nm) y potencial  $\zeta$  (mV) de los CDplejos de ADNp formulados con los derivados de CD miristoilados **27**, **29**, **53** y **55** a distinto N/P.

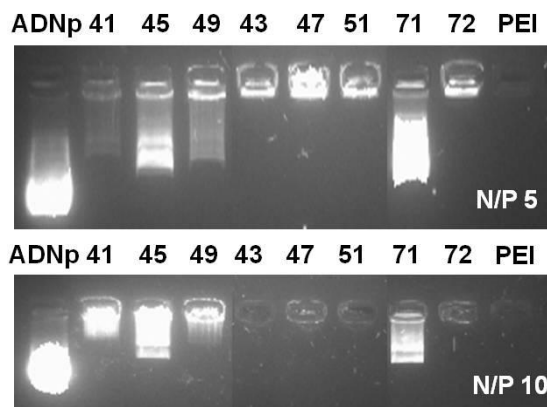
N/P		27	29	53	55
5	$\varnothing$ (nm)	137 $\pm$ 15	135 $\pm$ 11	228 $\pm$ 50	160 $\pm$ 30
	$\zeta$ (mV)	2 $\pm$ 15	27 $\pm$ 3	16 $\pm$ 5	20 $\pm$ 2
10	$\varnothing$ (nm)	103 $\pm$ 30	90 $\pm$ 6	150 $\pm$ 20	152 $\pm$ 26
	$\zeta$ (mV)	9 $\pm$ 12	14 $\pm$ 5	16 $\pm$ 3	20 $\pm$ 2
20	$\varnothing$ (nm)	102 $\pm$ 20	102 $\pm$ 14	111 $\pm$ 2	117 $\pm$ 11
	$\zeta$ (mV)	29 $\pm$ 3	42 $\pm$ 8	11 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1

Para examinar la capacidad de complejar y proteger de modo eficaz el ADN se llevaron a cabo experimentos de inhibición de movilidad electroforética en gel de agarosa, usando GelRed™ como agente intercalante. Por un lado, la inhibición de la migración catódica del ADNp en el gel de electroforesis formulado con los derivados de  $\alpha$ CD miristoilados (**27** y **29**) a N/P 5, 10 y 20 constata la neutralización electrostática del ácido nucleico por el vector. Por otro, la desaparición de la fluorescencia de GelRed™, que se activa al intercalarse entre las bases del ADNp, confirma su inaccesibilidad y protección frente al medio (Figura 5.20.). La capacidad de neutralización y protección de ADNp que muestran los derivados miristoilados resulta equiparable a la de la polietilenimina de alto peso molecular (25 kDa PEI), un vector de referencia comercial, lo que demuestra el equilibrio entre elementos hidrofílicos e hidrofóbicos de este tipo de estructuras.



**Figura 5.20.** Electroforesis en gel de agarosa de los CDplejos de ADNp formulados en HEPES con los derivados de  $\alpha$ CD miristoilados **27** y **29** en comparación con los poliplejos PEI:ADNp.

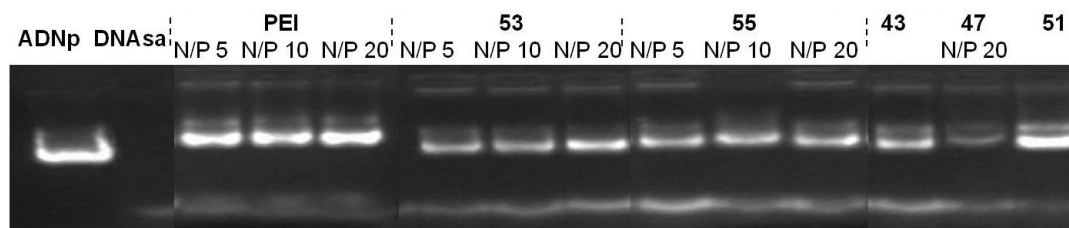
En caso de las CD funcionalizadas con segmentos aromáticos, la inhibición de la migración electroforética y la protección frente a agentes intercalantes es menos eficaz. En la Figura 5.21. se muestran los geles de los CDplejos formulados con los derivados de  $\beta$ CD. Las formulaciones a N/P 5 con los compuestos con baja densidad de carga (*o*-xilileno **41**, *m*-xilileno **45**, 1,8-dimetilnaftileno **49** y el control **71**) no inhiben completamente la movilidad electroforética del ADNp. En cambio, en el caso de los derivados densidad de carga alta (*o*-xilileno **43**, *m*-xilileno **47**, 1,8-dimetilnaftileno **51** y el control **72**) sí la inhiben completamente a N/P 5 y protegen del entorno completamente a N/P 10.



**Figura 5.21.** Electroforesis en gel de agarosa de los CDplejos de ADNp formulados en HEPES con los derivados de  $\beta$ CD de baja (*o*-xilileno **41**, *m*-xilileno **45**, 1,8-dimetilnaftileno **49** y control **71**) y alta densidad catiónica (*o*-xilileno **43**, *m*-xilileno **47**, 1,8-dimetilnaftileno **51** y control **72**) a valores de N/P 5 (arriba) y 10 (abajo).

Para confirmar la integridad del ADNp y su protección frente a agentes externos en el CDplejo, las formulaciones se incubaron con una DNasa, una enzima capaz de degradar el ADNp. En estas condiciones la fracción de ADN que no esté suficientemente protegido en el CDplejo será degradado y no será detectable su migración electroforética, como se aprecia en la línea 2 del gel (Figura 5.22.). El tratamiento con dodecilsulfato sódico (SDS) permite disociar los CDplejos y liberar su carga, que en todos los casos presenta unas propiedades electroforéticas similares a las del ADNp de partida. Este experimento permite concluir que tanto los derivados de CD miristoilados como los de  $\beta$ CD de alta densidad de carga funcionalizados con segmentos aromáticos no solo protegen eficazmente el material génico sino que mantienen su integridad.





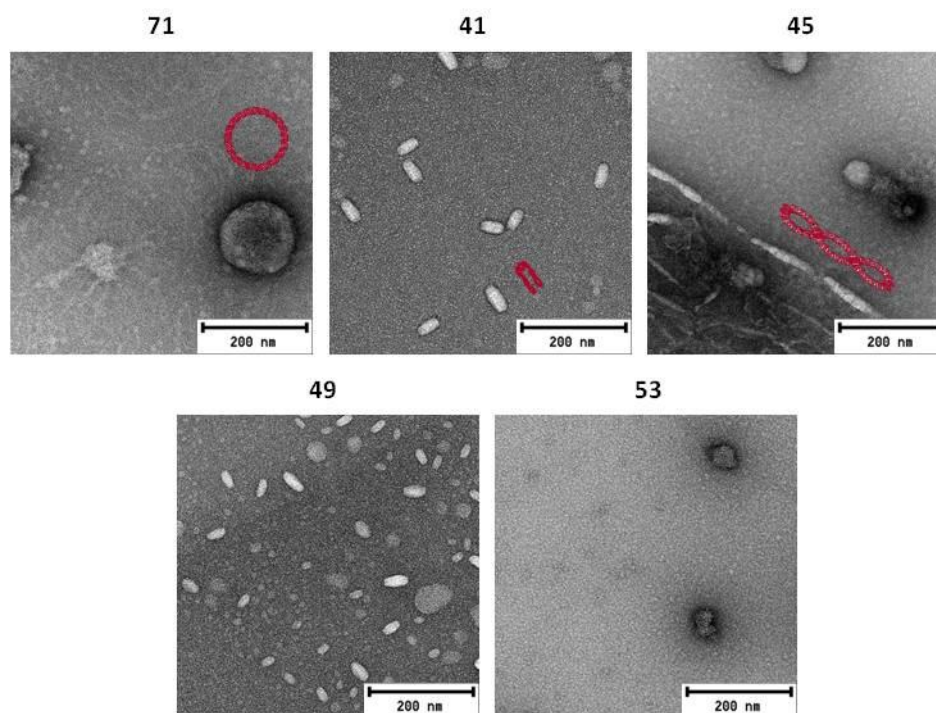
**Figura 5.22.** Experimento de comprobación de la integridad del ADNp después de tratamiento con DNAasa. La presencia de la banda fluorescente de la misma movilidad electroforética que la del ADNp de origen confirma la integridad del plásmido tras la disociación de CDplejo.

A la vista de los resultados, tanto los compuestos miristoilados derivados de  $\alpha$ CD (**27** y **29**) y  $\beta$ CD (**53** y **55**) así como los derivados de  $\beta$ CD con alta densidad de carga (**43**, **47** y **51**) formulados a N/P 20 muestran capacidad de condensar el ADNp en partículas de tamaño de 100-200 nm, potencial  $\zeta$  positivo (8-42 mV). Por este motivo, son los que se han investigado en transfección.

#### 5.4.3. Caracterización de los complejos con ADN (CDplejos) mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).

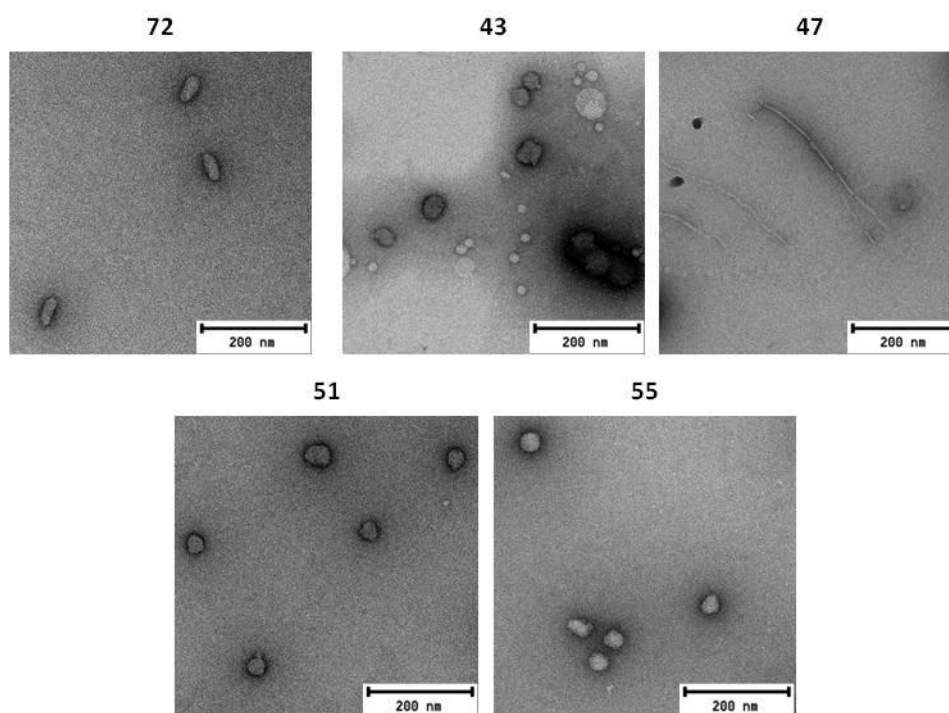
Resultados anteriores del grupo relacionan la estructura molecular con la capacidad de autoensamblaje y la morfología del agregado y las consecuencias en la capacidad de transfección.<sup>34</sup> La microscopía de transmisión electrónica (TEM) permite observar que las diferencias en la caracterización de CDplejos empleando DLS se pueden correlacionar con cambios en la morfología de las nanopartículas correspondientes. En esta Tesis, y con objeto de analizar la morfología de los CDplejos preparados se formularon, empleando el método de nanoprecipitación, los complejos de todos los derivados de  $\beta$ CD con ADNp a N/P 20 para asegurar la neutralización completa del plásmido. En el caso de los

derivados de  $\beta$ CD control **71** y de los derivados de baja densidad (**41**, **45**, **49** y **53**) se obtuvieron complejos con tamaños y formas muy característicos (Figura 5.23.). Mientras que las nanopartículas formadas por el control **71**, desprovisto de elemento de autoorganización, son esféricas y de gran tamaño ( $\sim 175$  nm), los CDplejos preparados a partir de los derivados de *o*-xilileno (**41**) y 1,8-dimetilnaftaleno (**49**) presentan una morfología de gusano muy diferente a los obtenidos a partir del derivado de *m*-xilileno (**45**) que son más alargadas. Sin embargo, los de **53** son pequeños y esféricos.



**Figura 5.23.** Micrografías TEM de los CDplejos formulados con ADNp y los derivados de  $\beta$ CD de baja densidad catiónica funcionalizados con *o*-xilileno (**41**), *m*-xilileno (**45**), 1,8-dimetilnaftaleno (**49**), miristoilo (**53**) y el derivado de control (**71**) a N/P 20.

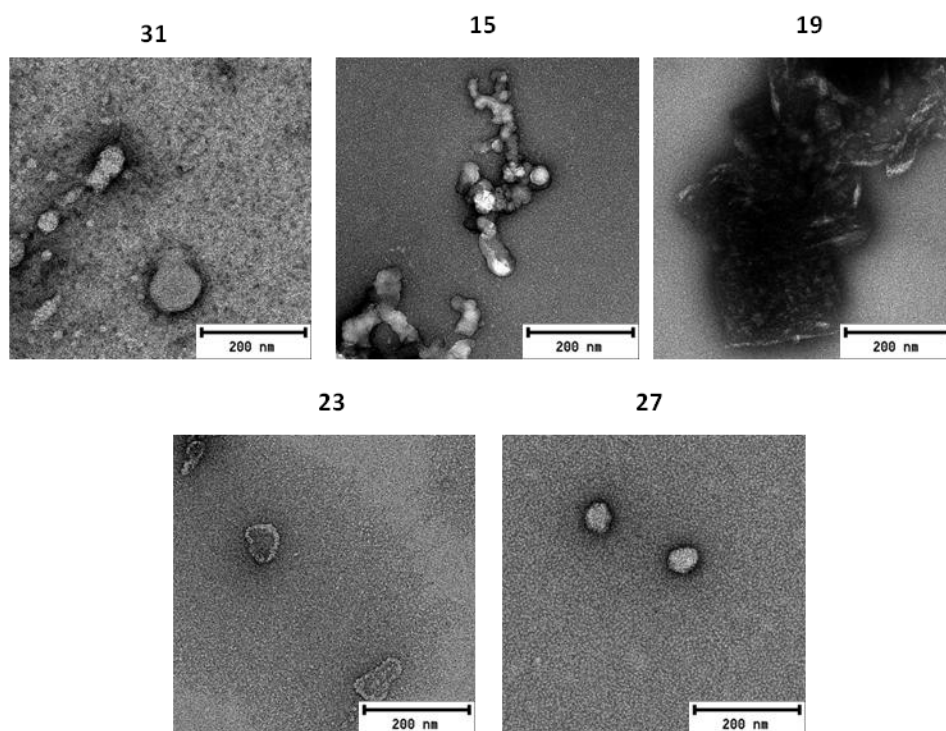
En la Figura 5.24. se muestran imágenes representativas de los CDplejos obtenidos con los derivados de  $\beta$ CD de alta densidad catiónica (**72**, **43**, **47**, **51** y **55**). El compuesto control **72** forma complejos de tamaño pequeño y alargados. El derivado de *m*-xilileno **47** forma nanoestructuras con una forma alargada y enrollada mientras que en el caso de los derivados de *o*-xilileno **43**, 1,8-dimetilnaftaleno **51** y el derivado miristoilado **55**, pueden observarse nanopartículas esféricas de pequeño tamaño.



**Figura 5.24.** Micrografías TEM de los CDplejos formulados con ADNp y los derivados de  $\beta$ CD de baja densidad catiónica funcionalizados con *o*-xilileno (**43**), *m*-xilileno (**47**), 1,8-dimetilnaftaleno (**51**), miristoilo (**55**) y el derivado de control (**72**) a N/P 20.

Los derivados de  $\alpha$ CD de baja densidad catiónica, a excepción del compuesto miristoilado (**27**), formaron agregados desordenados con ADNp a N/P

20 (Figura 5.25.). Estos resultados son consistentes con los anteriormente descritos que apuntan a que los derivados basados en  $\alpha$ CD no son capaces formar agregados ordenados con el material génico.



**Figura 5.25.** Micrografías TEM de los CDplejos formulados con ADNp y los derivados de  $\alpha$ CD de baja densidad catiónica funcionalizados con *o*-xilileno (**15**), *m*-xilileno (**19**), 1,8-dimetilnaftaleno (**23**), miristoilo (**27**) y el derivado de control (**31**) a N/P 20

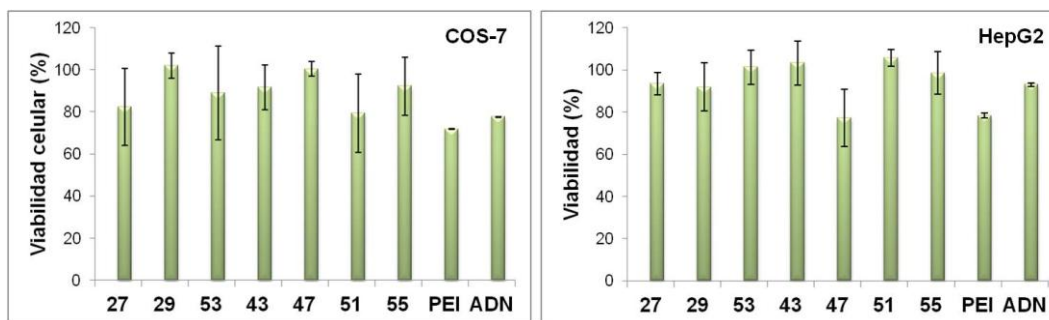
En general, los experimentos de microscopía de transmisión electrónica confirmaron los resultados obtenidos por DLS. La diferencia de tamaños o la indeterminación de este observados en algunos casos puede deberse a la presencia de la capa de solvatación de la nanopartícula, a la forma de estas o a la formación de agregados poco homogéneos.

#### 5.4.4. Eficiencia de transfección en células COS-7 y HepG2.

Los ensayos de viabilidad celular y de eficacia de transfección empleando un gen reportero que codifica la luciferasa pCMV-SV40 se han llevado a cabo empleando dos líneas celulares: células de riñón de primate COS-7 y células de hepatoblastoma humano HepG2. Ambas han sido usadas anteriormente en ensayos con vectores no virales basados en CD.<sup>14</sup> Con fines comparativos se utiliza como control negativo ADNp libre y como control positivo el vector de transfección génica comercial PEI (bPEI, 25 kDa) formulado en condiciones óptimas (N/P 10, HEPES glucosilado con un 10% de suero).<sup>51</sup> Los CDplejos se formularon a N/P 20 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

La toxicidad de los CDplejos se determinó a partir de la viabilidad celular. Ésta se calcula midiendo la diferencia de absorbancia producida tras la adición del reactivo Alamar Blue® a 600 nm. En respuesta a la reducción metabólica celular, el reactivo adquiere color rojo y absorbe a 570 nm. La absorbancia a esta longitud de onda es, por tanto, proporcional a la cantidad de células vivas.

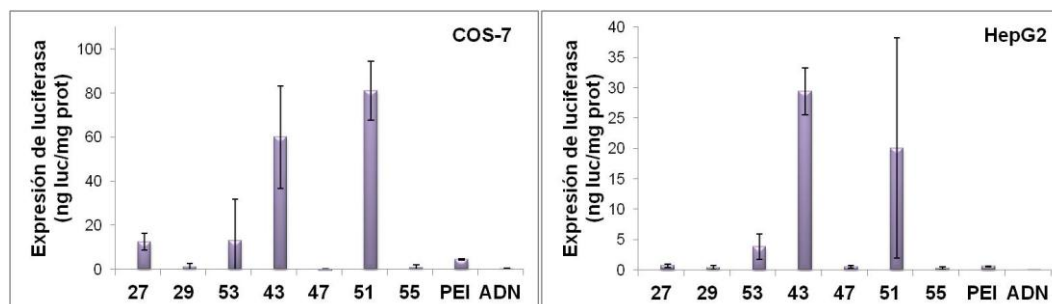
Los datos mostrados en la Figura 5.26. muestran valores de toxicidad de los CDplejos formulados inferiores al bPEI y al ADNp libre para las dos líneas celulares empleadas.



**Figura 5.26.** Viabilidad celular en COS-7 (izquierda) y HepG2 (derecha) de CDplejos en HEPES glucosilado 10 % de suero, formulados con los derivados miristoilados de  $\alpha$ CD (**27** y **29**) y de  $\beta$ CD (**53**, **43**, **47**, **51** y **55**) a N/P 20, PEI a N/P 10 y ADNp libre.

En la Figura 5.27. se observa los valores de expresión de la luciferasa en ambas líneas celulares de los CDplejos formulados. Los derivados de  $\beta$ CD **43** y **51** (con *o*-xilileno y 1,8-dimetilnaftileno, respectivamente), que forman CDplejos de menor tamaño ( $\sim 100$  nm) y con forma esférica, muestran una mayor eficacia de transfección. En concreto, el compuesto **43** muestra niveles de transfección 50 veces superior al vector de referencia PEI en células HepG2 y el derivado **51**, resultó 17 veces superior en células COS-7. El derivado análogo de  $\beta$ CD provisto de *m*-xilileno (**47**), presenta niveles de transfección muy inferiores, confirmando la importancia de la naturaleza del segmento aromático en las propiedades de transfección.

En el caso de los derivados con sustituyentes miristoilados, tanto los derivados de  $\alpha$ - como de  $\beta$ CD de baja densidad de carga (**27** y **53**) fueron superiores en eficacia de transfección respecto a los de mayor densidad de carga **29** y **55** en ambas líneas celulares.



**Figura 5.27.** Eficacia de transfección en COS-7 (izquierda) y HepG2 (derecha) de CDplejos en HEPES glucosilado 10 % de suero, formulados con los derivados de  $\alpha$ CD (27 y 29) y de  $\beta$ CD (53, 43, 47, 51 y 55) a N/P 20, PEI a N/P 10 y ADNp libre.

### 5.5. Conclusiones.

La ruta sintética incorpora diferentes segmentos hidrofóbicos a la cara secundaria de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ CD a partir de un precursor común. Además, su compatibilidad con la química clic permite ampliar la serie a derivados policationicos de mayor y menor densidad.

Los elementos promotores (*o*-xilileno y 1,8-dimetilnaftileno) o no (*m*-xilileno o cadena de miristoílo) del autoensamblaje ordenado de las CDs formando dímeros en solución acuosa y el balance hidrofilia-lipofilia permiten modular la forma y el tamaño de los CDplejos.

Los datos obtenidos con los CDplejos que forman los derivados de  $\alpha$ - y  $\beta$ CD miristoilados de menor densidad de carga (27 y 53, respectivamente) a N/P 20 muestran características de tamaño, potencial zeta y forma similares (esféricos) y una mayor transfección en ambas líneas celulares que sus homólogos poliaminotriazólicos (29 y 55). El hecho de que hayan sido los únicos derivados de  $\alpha$ -CD capaces de formar CDplejos invita a dar mayor relevancia al óptimo balance hidrofilia-lipofilia que al efecto que proporciona la plataforma oligosacáridica.



Aquellos compuestos que poseen los clips aromáticos promotores de la dimerización estudiados en el Capítulo 3 y 4: *o*-xilileno y 1,8-dimetilnaftileno (**43** y **51**, respectivamente); proporcionan CDplejos ovalados o redondos en función de la densidad de carga, siendo estos últimos los que muestran unos mayores resultados de transfección en ambas líneas celulares. Los CDplejos que forma **43** a N/P 20 muestran valores incluso 50 veces superior al vector de referencia bPEI en HepG2.

Destaca el hecho de que el sutil cambio de anillo de *o*- (**41** y **43**) a *m*-xilileno (**45** y **47**) cambia drásticamente las propiedades de los CDplejos: adquieren una disposición alargada y enrollada asemejándose a una cadena y muestran valores de transfección muy inferiores. Así, la capacidad de autoorganización de forma ordenada de estos compuestos formando una bicapa CD<sub>2</sub>-ADNp-CD<sub>2</sub> en el CDplejo resulta muy ventajosa para mejorar los resultados de transfección en COS-7 y en HepG2.

Por tanto, pequeños cambios en el diseño del vector son relevantes para la manipulación de sus propiedades supramoleculares pudiendo influir en el tamaño, la morfología y la capacidad de transfección de los sistemas de transfección no virales derivados de  $\alpha$ - y  $\beta$ CD.



- 
- <sup>1</sup> S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, A. L. Schacht, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 203-214.
- <sup>2</sup> L. Naldini, *Nature* **2015**, *526*, 351-360.
- <sup>3</sup> A. B. Hill, M. Chen, C.-K. Chen, B. A. Pfeifer, C. H. Jones, *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 91-105.
- <sup>4</sup> a) K. B. Kaufmann, H. Buning, A. Galy, A. Schambach, M. Grez, *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 1642-1661; b) M. A. Kotterman, T. W. Chalberg, D. V. Schaffer, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2015**, *17*, 63-89.
- <sup>5</sup> a) S. Nayak, R. W. Herzog, *Gene Ther.* **2010**, *17*, 295-304; b) S. H. Orkin, P. Reilly, *Science* **2016**, *352*, 1059-1061.
- <sup>6</sup> <http://www.abedia.com/wiley/>
- <sup>7</sup> <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm589467.htm>
- <sup>8</sup> a) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>; b) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-glybera-expiry-marketing-authorisation-european-union\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-glybera-expiry-marketing-authorisation-european-union_en.pdf); c) <https://www.technologyreview.es/s/5853/el-farmaco-mas-carro-del-mundo-ilustra-el-fracaso-del-sueno-de-la-terapia-genica>; d) T. J. Conlon, F. Mavilio, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2018**, *8*, 181-182.
- <sup>9</sup> H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, D. J. Anderson, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541-555.
- <sup>10</sup> D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *4*, 581-593.
- <sup>11</sup> B. Draghici, M. A. Ilies, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4091-4130.
- <sup>12</sup> B. S. Sumerlin, A. P. Vogt, *Macromolecules* **2010**, *43*, 1-13.
- <sup>13</sup> a) W.-B. Zhang, X. Yu, C.-L. Wang, H.-J. Sun, I.-F. Hsieh, Y. Li, X.-H. Dong, K. Yue, R. Van Horn, S. Z. D. Cheng, *Macromolecules* **2014**, *47*, 1221-1239; b) J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.
- <sup>14</sup> J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *42*, 18-37.
- <sup>15</sup> C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6728-6742.
- <sup>16</sup> E. Nakamura, H. Isobe, N. Tomita, M. Sawamura, S. Jinno, H. Okayama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4254-4257.
- <sup>17</sup> B. Vinciguerra, L. Cao, J. R. Cannon, P. Y. Zavalij, C. Fenselau, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13133-13140.
- <sup>18</sup> I. Nierengarten, M. Nothisen, D. Sigwalt, T. Biellmann, M. Holler, J.-S. Remy, J. F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17552-17558.

- <sup>19</sup> E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy, S. Ulrich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10183-10187.
- <sup>20</sup> J. L. Jiménez Blanco, F. Ortega-Caballero, L. Blanco-Fernández, T. Carmona, G. Marcelo, M. Martínez-Negro, E. Aicart, E. Junquera, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 10117-10120.
- <sup>21</sup> En la mitología romana, Jano es el dios de los portales, los comienzos, las transiciones y los finales, y es representado con dos caras que miran a ambos lados de su perfil.
- <sup>22</sup> H. Liu, J. Luo, W. Shan, D. Guo, J. Wang, C.-H. Hsu, M. Huang, W. Zhang, B. Lotz, W. B. Zhang, T. Liu, K. Yue, S. Z. D. Cheng, *ACS Nano* **2016**, *10*, 6585-6596.
- <sup>23</sup> A. Díaz-Moscoso, L. Le Gourriérec, M. Gomez-García, J. M. Benito, P. Balbuena, F. Ortega-Caballero, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888.
- <sup>24</sup> a) C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, J. M. Benito, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1586-1608; b) W.-F. Lai, *Biomaterials* **2014**, *35*, 401-411.
- <sup>25</sup> J. E. Zuckerman, M. E. Davis, *Nature Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 843-856.
- <sup>26</sup> S.-A. Cryan, A. Holohan, R. Donohue, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21*, 625-633.
- <sup>27</sup> a) S. Srinivasachari, K. M. Fichter, T. M. Reineke, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4618-4627; b) N. Mourtzis, M. Paravatou, I.M. Mavridis, M.L. Roberts, K. Yannakopoulou, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4188-4200; c) V. Bennevault-Celton, A. Urbach, O. Martin, C. Pichon, P. Guégan, P. Midoux, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2404-2414.
- <sup>28</sup> a) A. McMahon, E. Gómez, R. Donohue, D. Forde, R. Darcy, C.M. O'Driscoll, *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* **2008**, *18*, 303-407; b) A. Díaz Moscoso, P. Balbuena, M. Gómez García, C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, P. Vierling, N. Micali, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2008**, 2001-2003; c) F. Ortega-Caballero, C. Ortiz Mellet, L. Le Gourriérec, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, J. M. García Fernández, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5143-5146.
- <sup>29</sup> a) A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684; b) A. Méndez-Ardoy, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, F. Santoyo-González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882-5894; c) C. Bienvenu, A. Martínez, J. L. Jiménez Blanco, C. Di Giorgio, P. Vierling, C. Ortiz Mellet, J. Defaye, J.M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5570-5581; d) A. Martínez, C. Bienvenu, J. L. Jiménez Blanco, P. Vierling, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, C. Di Giorgio, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8143-8148; e) I. Pflueger, C. Charrat, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, C. Di Giorgio, J. M. Benito, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10037-10049; f) A. Díaz-Moscoso, N. Guilloteau, C. Bienvenu, A. Méndez-Ardoy, J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Biomaterials* **2011**, *32*, 7263-7273.

- <sup>30</sup> a) M. J. O'Neill, J. Guo, C. Byrne, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Int. J. Pharm.* **2011**, *413*, 174-183; b) A. Díaz-Moscoso, D. Vercauteren, J. Rejman, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, S. C. De Smedt, J. M. García Fernández, *J. Control. Release* **2010**, *143*, 318-325; c) N. Guilloteau, C. Bienvenu, C. Charrat, J. L. Jiménez Blanco, A. Díaz-Moscoso, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. Vierling, C. Di Giorgio, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 29135-29144.
- <sup>31</sup> a) M. Gooding, M. Malhotra, D.J. McCarthy, B.M.D.C. Godinho, J.F. Cryan, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *71*, 80-92; b) J. Guo, J.R. Ogier, S. Desgranges, R. Darcy, C. O'Driscoll, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7775-7784; c) N. Symens, A. Méndez-Ardoy, A. Díaz-Moscoso, E. Sánchez-Fernández, K. Remaut, J. Demeester, J. M. García Fernández, S. C. De Smedt, J. Rejman, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *33*, 1276-1289.
- <sup>32</sup> C. Aranda, K. Urbiola, A. Mendez-Ardoy, J.M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, C. Tros de Ilarduya, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 390-397.
- <sup>33</sup> L. Gallego-Yerga, L. Blanco-Fernández, K. Urbiola, T. Carmona, G. Marcelo, J. M. Benito, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12093-12104.
- <sup>34</sup> L. Gallego Yerga, J. M. Benito, L. Blanco Fernández, M. Martínez Negro, I. Vélaz, E. Aicart, E. Junquera, C. Ortiz Mellet, C. Tros de Ilarduya, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 3825-3835.
- <sup>35</sup> P. Evenou, J. Rossignol, G. Pembouong, A. Gothland, D. Colesnic, R. Barbeyron, S. Rudiuk, A.-G. Marcelin, M. Ménand, D. Baigl, V. Calvez, L. Bouteiller, M. Sollogoub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7753-7758.
- <sup>36</sup> L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6622-6627.
- <sup>37</sup> a) T. Neva, T. Carmona, J. M. Benito, C. Przybylski, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5588-5597; b) T. Neva, T. Carmona, J. M. Benito, C. Przybylski, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Front. Chem.* **2019**, *7*, 72.
- <sup>38</sup> a) B. Roizel, J. P. Baltaze, P. Sinaÿ, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2371-2373; b) S. Xiao, M. Yang, P. Sinaÿ, Y. Blériot, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1510-1516.
- <sup>39</sup> a) K. Chmurski, J. Defaye, *Supramol. Chem.* **2000**, *12*, 221-224; b) A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 78-80.
- <sup>40</sup> K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **1989**, *2*, 203-221.
- <sup>41</sup> a) R. Ghosh, P. Zhang, A. Wang, C. Ling, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1548-1552; b) R. Ghosh, H. Cormac, C. Ling, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5227-5233.
- <sup>42</sup> P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 903-908.

- 
- <sup>43</sup> J. Boger, R. J. Corcoran, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *1*, 2190-2218.
- <sup>44</sup> a) D. Díaz Díaz, M. G. Finn, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, C. J. Hawker, *An. Quim.* **2008**, *104*, 173-180; b) M. Meldal, C. Wenzel Tornøe, *Chem Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- <sup>45</sup> F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951-1954.
- <sup>46</sup> C. Ortiz-Mellet, J. M. Benito, J. M. García Fernández, H. Law, K. Chmurski, J. Defaye, M. L. O'Sullivan, H. N. Caro, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2523-2531.
- <sup>47</sup> a) P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, Wiley-Interscience, Hoboken, 2007, pp. 179; b) J. Xia, J. L. Alderfer, R. D. Locke, K. L. Matta, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2752-2759.
- <sup>48</sup> a) M. Skiba, D. Wouessidjewe, F. Puisieux, D. Duchêne, A. Gulik, *Int. J. Pharm.* **1996**, *142*, 121-124; b) H. C. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, C. U. S. Thies, USA Patent 5, 118, 528, **1992**.
- <sup>49</sup> Y. Xu, S. W. Hui, P. Frederik, F. C. Szoka Jr. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 341-353.
- <sup>50</sup> M. Muñoz-Úbeda, S. K. Misra, A. L. Barrán-Berdón, C. Aicart-Ramos, M. B. Sierra, J. Biswas, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014-18017.
- <sup>51</sup> S. Nimesh, A. Goyal, V. Pawar, S. Jayaraman, P. Kumar, R. Chandra, Y. Singh, K. C. Gupta, *J. Controlled Release* **2006**, *110*, 457-468.

# Capítulo 6

## Conclusiones Generales.



## 6. Conclusiones Generales.

El conjunto de resultados obtenidos en esta Tesis permite extraer las siguientes conclusiones:

**PRIMERA.** La estrategia de didesmetilación regioselectiva de las posiciones O-2 y O-3 de dos unidades de glucopiranosas contiguas permite incorporar en la cara secundaria de la  $\beta$ CD diferentes sistemas aromáticos con distancias de enlace apropiadas (*o*-xilileno, *m*-xilileno, 1,8-dimetilnaftileno y 2,3-dimetilnaftileno) mediante un doble puente de tipo éter.

**SEGUNDA.** Los clips aromáticos modulan la estructura de los correspondientes macrociclos. El anillo de *orto*-xilileno adopta una disposición semi-abierta respecto al macrociclo que conserva la típica cavidad toroidal. En contraste, el *meta*-xilileno se dispone de modo totalmente abierto y fuerza la inversión de la conformación en una de las unidades de glucopiranosas de  ${}^4C_1$  a  ${}^1C_4$ . En consecuencia el macrociclo modifica su cavidad de circular a ovoide. En el caso de los clips de naftileno también se observan diferencias significativas: el anillo de 1,8-dimetilnaftileno adquiere una disposición totalmente abierta respecto a la cavidad de la CD mientras que el 2,3-derivado se dispone en forma de tapadera.

**TERCERA.** La funcionalización con los clips aromáticos permite además controlar las capacidades supramoleculares de dimerización e inclusión de los macrociclos. El derivado de *o*-xilileno forma dímeros estables y complejos de estequiometría 1:1 con huéspedes esféricos como el adamantano carboxilato (**AC**). En cambio, la presencia del clip de *m*-xilileno promueve la presencia de especies monoméricas en agua y el cambio en la cavidad restringe el acceso de

la cavidad a huéspedes planos como **MN**. La incorporación de clips de naftileno permite la formación de dímeros de diferente estabilidad en disolución acuosa. El derivado de 1,8-dimetilnaftileno forma dímeros estables en los que los anillos aromáticos actúan como paredes que extienden la cavidad disponible y forman especies ternarias con huéspedes como el **AC**. En el caso del 2,3-dimetilnaftileno, la mayor flexibilidad de los clips aromáticos tiende a separar las unidades de CD de la especie dimérica de manera que la complejación con **AC** desencadena la disociación del dímero.

**CUARTA.** La estrategia sintética es compatible con la incorporación de dos clips aromáticos como elementos de control supramolecular.

**QUINTA.** Se han preparado dos series de derivados catiónicos de  $\alpha$  y  $\beta$ -CD que incorporan cabezas de aminometiltriazol con diferente densidad de carga en la cara primaria y clips aromáticos o cadenas de miristoilo en la cara secundaria.

La serie de compuestos sintetizados permite relacionar su estructura con la morfología y las propiedades de transfección de los CDplejos que forman con ADNp.

De los derivados de  $\alpha$ CD, sólo los derivados miristoilados forman complejos de tamaño adecuado para transfección confirmando el papel hidrofóbico determinante de las cadenas.

En el caso de los derivados de  $\beta$ CD, los diferentes clips incorporados condicionan la forma de los CDplejos. Los compuestos con clips de *o*-xilileno y 1,8-dimetilnaftileno a N/P 20 forman CDplejos pequeños de forma redonda u ovalada en función de la densidad de carga. Estos resultaron ser hasta 50 veces superiores en transfección en células HEPG-2 al vector de referencia bPEI. En cambio, el CDplejo resultante del derivado de *m*-xilileno, adquiere una forma



alargada y enrollada con capacidad de transfección inferior tanto en células COS-7 como HEPG-2. El cambio sutil del anillo aromático tiene consecuencias enormes en la forma y en la capacidad de transfección de los CDplejos.



# Chapter 7

Experimental Part.



## 7. Experimental Part.

### 7.1. General Methods.

**Reagents and solvents** were purchased from commercial sources and used without further purification.

**Thin-layer chromatography (TLC)** was performed on aluminum sheets coated with *Silica Gel 60 F<sub>254</sub> Merck*, with visualization by UV light (254 nm) and by charring with 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol or ninhydrin 0.1% in ethanol and heating at 100 °C.

**Column chromatography** was carried out on *Silicagel 60 (E. Merck, Geduran® Si 60, 40-63 µm)*.

**Optical rotation** data were recorded at 20 °C in a 1-dm tube on a Perkin-Elmer 141 MC Polarimeter, using the D-line of a sodium lamp (589 nm). Samples were dissolved in CHCl<sub>3</sub>, DCM, MeOH, H<sub>2</sub>O or DMSO at concentrations in a range 0.45 to 1.0% w/v.

**Elemental analyses** were performed using an elemental analyser *Leco TruSpec CHN*.

**<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra** were recorded on Bruker 400 (400 and 100.6 MHz), Bruker Ascend 400/R (400 and 100.6 MHz), Bruker Ascend 500 (500 and 125.7 MHz) and Bruker Ascend 600 (600 and 150.8 MHz) spectrometers. 2D COSY (Correlated Spectroscopy), 1D and 2D TOCSY (Totally Correlated Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence

Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation), 2D ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy) and 2D NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) experiments were employed to assist NMR assignments.  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{DMSO}-d_6$  and  $\text{D}_2\text{O}$  have been used as solvents. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in parts per million (ppm) relative to the residual solvent peak. The values of the coupling constants ( $J$ ) are measured in Hz. The abbreviations to indicate the multiplicity of the signals are: s (singlet), d (doublet), t (triplet), c (quartet), q (quintet) and m (multiplet). The abbreviation "b" indicates that the signal is "broad".

For **electrospray mass spectra (ESI-MS)**, sub- $\mu\text{M}$  sample concentrations in MeCN, MeOH or  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH were used, the mobile phase consisting of 50% aq MeOH at  $0.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and were obtained with a *Bruker Esquire 6000*.

**MALDI** experiments were carried out in collaboration with C. Przybylski (Sorbonne Université, Paris, France). Samples for **MALDI-MS** analysis were prepared by mixing  $1 \mu\text{L}$  of sample ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in methanol-water (70:30 v/v)) and an identical volume of matrix (DBH,  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 1:1 water-methanol (v/v)). Then, a volume of  $1 \mu\text{L}$  of the mixture was deposited on a mirror polished stainless steel MALDI target and allowed to dry at room temperature and atmospheric pressure during 20 min. **MALDI-TOF MS** experiments were performed using an Autoflex III MALDI-TOF/TOF spectrometer. This instrument was equipped with a Nd:YAG SmartBeam laser (355 nm) pulsed at a 200 Hz frequency. The mass spectrometer was operated with an accelerating potential of 19 kV. Mass spectra were recorded with extraction delay set to 300 ns and accumulation of 600 laser shots. Mass spectra were automatically processed with

Flex Analysis 3.0 software (Bruker Daltonics Inc.). The instrument was calibrated using standard peptide and protein mixtures provided by the manufacturer.

The **electrospray ionization-high resolution mass spectrometry (ESIHRMS)** experiments were performed using a LTQ-Orbitrap XL ETD instrument from Thermo Scientific operated in positive ionization mode with a spray voltage at +3.6 kV. Samples were prepared at 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in methanol/water (20:80 or 70:30 v/v). Once prepared, the fresh solutions were continuously infused at 3  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  using a 250- $\mu\text{L}$  syringe. The applied voltages were 45 and 120 V for the ion transfer capillary and the tube lens, respectively. The ion transfer capillary was held at 275 °C. The resolution level was set to 30000 ( $m/z = 400$ ) for all studies, while the  $m/z$  range was set to  $m/z$  200—2000 in the profile mode and in the normal mass ranges. The spectra were analysed using XCalibur 2.0.7 acquisition software (Thermo Scientific) without smoothing and background subtraction. The automatic gain control (AGC) allowed accumulation up to  $2 \times 10^5$  ions. The maximum injection time was set to 500 ms using 1  $\mu\text{scan}$  count.

The **fluorescent measurements** were carried out in collaboration with Prof. F. Mendicuti (Univ. Alcalá de Henares). Steady-state fluorescence measurements were performed by using a high sensitivity spectrofluorimeter, the SLM 8100C Aminco, equipped with a cooled photomultiplier and a double (single) monochromator in the excitation (emission) path. Excitation and emission slit widths were selected at 8-nm for both channels. Polarizers were set at the magic angle conditions.

The fluorescence decay measurements were achieved on a Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) FL900 Edinburgh Instruments Spectrometer. A NanoLed (Horiba), which emits short repetitive optical pulses at

296 nm, was used as a light source to excite the aromatic groups. The system was equipped with two concave grating monochromators at both the excitation and emission paths and a red sensitive photomultiplier also immersed in a Peltier cooled housing. No polarizers were used. Data acquisition was carried out by using a multichannel time detector and a time window width of 200 ns with a total of 10,000 counts at the intensity maximum. The instrumental response function was regularly obtained by measuring the scattering of a Ludox solution. The cells housing temperature for both instruments were thermostatically controlled by using a Pt-100 probe with digital temperature processors. Right angle geometry and cylindrical quartz 2-mm inner path cells of 120  $\mu\text{L}$  capacity were used for most of the experiments.

The **induced circular dichroism (ICD)** measurements were performed in collaboration with Prof. F. Mendicuti (Univ. Alcalá de Henares), in a JASCO J-715 spectropolarimeter from 300 to 200 nm. Measurements conditions were fixed to 10-nm band width, 3 repetitions per sample, 1-mm cell path and scanning speed 20 nm $\cdot$ min $^{-1}$ .

The **computational calculations** were carried out in collaboration with Prof. F. Mendicuti (Univ. Alcalá de Henares). **Molecular Mechanics (MM) and Molecular Dynamics (MD)** calculations were performed with Sybyl X2.0<sup>1</sup> and the Tripos Force Field.<sup>2</sup> A relative permittivity  $\epsilon = 3.5$  ( $\epsilon = 1$ ) was used in the vacuum (in the presence of water). Charges for  $\beta\text{CD}$  derivatives were obtained by MOPAC.<sup>3</sup>

**NMR-monitored titration experiments and association constant ( $K_a$ ) determination for the inclusion complexes.** Association constants ( $K_a$ ,  $\text{M}^{-1}$ ) for the inclusion complexes were determined in phosphate-buffered  $\text{D}_2\text{O}$  (pD 7.4, 0.1



M) at 298 K by measuring the chemical shift variations ( $\Delta\delta$ , ppm) in the  $^1\text{H}$  NMR spectra (500 MHz) of a solution of the CD derivatives in the presence of increasing amounts of the guest. Typically, a stock solution of CD (ca. 0.5-1 mM) was prepared. A 500  $\mu\text{L}$  aliquot of this solution was transferred to a NMR tube and the initial NMR spectrum was recorded. Then, a solution of the guest (15-20 mM) was prepared in the stock CD solution. Aliquots of the this solution were sequentially added to the NMR tube and the corresponding spectrum was recorded after equilibration. Additions and measurements were continued until 90-100% complexation had been achieved. The chemical shifts of selected host resonances obtained at approximately 15 different host-guest concentration ratios were plotted against the concentration of CD and used in an iterative least-squares fitting procedure using a 1:1 stoichiometry binding model.<sup>4,5</sup> Errors are estimated in  $\pm 15\%$ .

**Preparation of CD-*ct*DNA complex (CDplex) using nanoprecipitation method.**<sup>6</sup> A 2.5 mM CD solution in DMSO was prepared and the necessary volume of this was added (to obtain the desired N/P ratio, 1, 2, 5, 10) to a solution of *ct*DNA 2.5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (7.58  $\mu\text{M}$  phosphate) in water or HEPES (10 mM, pH 7.4). Subsequently, the preparation was vortexed to form the corresponding CDplex and kept at rt for 30 min.

**Preparation of CD-*ct*DNA complex (CDplex) using thin film method.**<sup>7</sup> A 2.5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  solution of *ct*DNA (7.58  $\mu\text{M}$  phosphate) in water or HEPES (10 mM, pH 7.4) was prepared. On the other hand, in an eppendorf, the required volume of a CD solution 0.30-0.37 mM in MeOH was taken to obtain the desired N/P ratio (1, 2, 5, 10). The volatile solvent was evaporated using a flow of  $\text{N}_2$  and a soft vacuum leading to the formation of a thin layer of the compound in the eppendorf walls. The thin layer was subsequently rehydrated with the HEPES buffer and

vortexed. Finally, the preparation was added to the solution containing the nucleic acids, vortexed to form the corresponding CDplex and kept at rt for 30 min.

**Preparation of CD-pDNA.** The preparation of the pDNA complexes from the CD and the reference vector bPEI (branched polyethyleneimine) has been performed according to a nanoprecipitation procedure which has been detailed elsewhere.<sup>8</sup> For in vitro assays the quantities of compounds used were calculated according to the desired DNA concentration of  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $15 \mu\text{M}$  phosphate), the molecular weight, and the number of protonable nitrogen atoms in the selected CD derivative or cationic polymer (bPEI, 25 kDa). pDNA complexes and polyplexes were prepared with plasmid DNA (luciferase-encoding plasmid eFLuc pCMV-SV40pA, 5739 base pairs) and the corresponding CD-based molecular vector or bPEI, respectively, at N/P ratios of 5, 10 and 20. pDNA was diluted in glucosylated HEPES buffer (GHB) (HEPES 10 mM, pH 7.4, glucose 5% w/v). Then the desired amount of derivative was added from 1000 or 3000  $\mu\text{M}$  stock solutions in DMSO, DMSO- $\text{H}_2\text{O}$  1:1 or  $\text{H}_2\text{O}$  in order to achieve the desired concentrations of the derivatives for the final N/P ratio. The preparation was vortexed for 2 h and used for characterization or transfection experiments. For bPEI, a 1 M solution of bPEI in  $\text{H}_2\text{O}$  was diluted with distilled water to a final concentration of 0.01 M. A solution of pDNA ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in GHB was mixed with the same VOLUME of a bPEI solution containing the desired amount of polymer, to give a  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  DNA solution. The preparation was briefly vortexed and kept at rt for 30 min.

**Agarose gel electrophoresis** was carried out in collaboration with Prof. C. Tros de Ilarduya (Univ. Navarra). Each CD-pDNA complex (20  $\mu\text{L}$ , 0.4  $\mu\text{g}$  of pDNA) was submitted to electrophoresis for about 30 min under 150 V through a

0.8% agarose gel in TBE 1x (Tris-borate-EDTA) buffer and stained by spreading GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium). The pDNA was then visualized after photographing on an *Alphaimager Mini UV* transilluminator. The plasmid integrity in each sample was confirmed by electrophoresis after decomplexation with sodium dodecyl sulphate (SDS, 15 %).

**DNA condensation/protection assays** were carried out in collaboration with Prof. C. Tros de Ilarduya (Univ. Navarra). Samples of the CDplexes (40  $\mu\text{L}$ ) at N/P ratios of 5, 10 and 20 were prepared in water or DMSO or DMSO:water (1:1) with a final concentration of 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The samples were subjected to electrophoresis for 30 min under 150 mV in 0.8% agarose gel. For protection assays, DNase I (1  $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}$  pDNA) was added to each sample and the samples were stirred for 30 min at 37 °C. EDTA (4  $\mu\text{L}$ , 0.25 M) was added to inactivate DNase I and the samples were vortexed and incubated for 5 min. SDS (5  $\mu\text{L}$ , 25 %) was then added and the samples were further incubated for 5 min. The samples were subjected to electrophoresis as described above. The plasmid integrity was compared with free pDNA both treated and untreated.

**Particle-size, polydispersity index (PI) and  $\zeta$ -potential measurements.** The size of the CDplexes was measured by dynamic light scattering (DLS) and the overall charge by “Mixed Mode Measurement” phase analysis light scattering (M3-PALS) by using a *Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)* with the following specification: sampling time, automatic; number of measurements, 3 per sample; medium viscosity, 1.054 cP; refractive index, 1.33; scattering angle, 173°;  $\lambda$  633 nm; temperature, 25 °C. Data were analyzed using the multimodal number distribution software included in the instrument. Measurements were performed in HEPES buffer (10 mM, pH 7.4), GHB 5% (11 mM, pH 7.4) or  $\text{H}_2\text{O}$  in triplicate. Size results are given as volume distribution of

the major population by the mean diameter with its standard deviation. No significant differences were encountered when the data were expressed in intensity distribution. Before each series of experiments, the performance of the instruments was checked with either a 90 nm monodisperse latex beads (Coulter) for DLS or with DTS 50 standard solution (Malvern) for  $\zeta$ -potentials.

**Transmission electron microscopy (TEM).** Formvar-carbon-coated grids (Cu, 200 mesh), previously made hydrophilic by glow discharge, were placed on top of small drops of the CDplexes (HEPES 20 mM, pH 7.4, pDNA 242  $\mu$ M phosphate) prepared as describe above by using an N/P ratio of 20. After 1-3 min, the grids were negatively stained with a few drops of 1% aqueous solution of uranyl acetate. The grids were then dried and observed with a Philips CM12 electron microscope working under standard conditions. All these experiments were reproduced twice on each formulation.

**Cell culture.** HepG2 (human hepatoblastoma) and COS-7 (African green monkey kidney) cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were maintained at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in complete medium constituted by Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose + glutaMAX® (Gibco BRL Life Technologies) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U·mL<sup>-1</sup>) and streptomycin (100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>). Cells were passaged by trypsinization twice a week.

**In vitro transfection activity.** The procedure for the in vitro transfection assays was the same for the HepG2 and COS-7 cell lines. The cells were seeded in medium in 48-well plates (Iwaki Microplate, Japan) and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. After this, the medium was removed and aliquots (0.3 mL) of serum (activated FBS) and of the complexes (0.2 mL) (containing 1  $\mu$ g of pDNA)

were added to each well. After 4 h of incubation the medium was replaced for complete medium and the cells were further incubated for 48 h. The cells were washed with PBS and lysed with reporter lysis buffer (100  $\mu$ L) (Promega, Madison, WI, USA) at room temperature for 10 min, followed by a freeze-thaw cycle. An aliquot of the supernatant (20  $\mu$ L) was assayed for total luciferase activity by using the luciferase assay reagent (Promega), according to the protocol of the manufacturer. A luminometer (Sirius-2, Berthold Detection Systems, Innogenetics, Diagnóstica y Terapéutica, Barcelona, Spain) was used to measure the luciferase activity. The protein content of the lysates was measured by the DC protein assay reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) by using bovine serum albumin as standard. The data were expressed as nanograms (ng) of luciferase (based on a standard curve for luciferase activity) per milligram (mg) of protein. The data were calculated from three or four repetitions in two fully independent experiments (formulation and transfection).

**Cell viability.** Cell viability was quantified by a modified AlamarBlue® assay (Invitrogen). A sample of 10 % (v/v) AlamarBlue dye in complete medium (1 mL) was added to each well 48 h post-transfection. After 2.5 h of incubation at 37 °C, an aliquot (200  $\mu$ L) of the supernatant was assayed by measuring the absorbance at 570 and 600 nm. The cell viability (as percentage of control cells) was calculated according to the formula  $(A_{570} - A_{600})$  of treated cells  $\times 100 / (A_{570} - A_{600})$  of control cells.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed by using the SPSS software from SPSS Inc. (Chicago, IL, USA). The analysis of the transfection efficiency of the CDplexes was performed with a two-tailed unpaired Student's t-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Boc cleavage** was realized dissolving the compound N-Boc protected with 1:1 TFA-H<sub>2</sub>O (20 mg per mL) at rt for 5 h, followed by evaporation of the solvent and freeze-drying from a diluted aq HCl solution 3 times.

## 7.2. Starting Materials.

The following starting materials were prepared according to reported procedures:

Heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (**58**).<sup>9</sup>

2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-Nonadeca-*O*-methylcyclomaltoheptaose (**59**).<sup>10</sup>

2<sup>II,III,V-VII</sup>,3<sup>I,III,IV,VI,VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-Heptadeca-*O*-methylcyclomaltoheptaose (**60**).<sup>11</sup>

2,3-Dibromomethyl-naphthalene<sup>12</sup>

Hexakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltohexaose (**73**).<sup>13</sup>

Hexakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltohexaose (**70**).<sup>14</sup>

Hexakis(6-azido-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltohexaose (**74**).<sup>15</sup>

Heptakis(6-azido-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (**75**).<sup>16</sup>

Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**67**).<sup>13</sup>

Heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (**68**).<sup>13</sup>

Heptakis(6-bromo-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl)cyclomaltoheptaose (**69**).<sup>17</sup>

*N*-*tert*-butoxycarbonyl propargylamine (**77**).

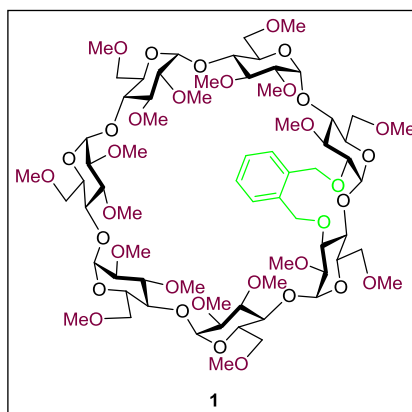
*N*-[bis(*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)] propargylamine (**78**).<sup>18</sup>

Heptakis{6-[4-(aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl}cyclomaltoheptaose (**71**).<sup>19</sup>

Hepakis{6-[4-(*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl}cyclomaltoheptaose (**72**).<sup>16</sup>

### 7.3. New Compounds.

#### *Clipped cyclodextrins.*



#### **2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*o*-Xylylene)-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-nonadeca-O-**

**methylcyclomaltoheptaose (1).** A solution of freshly lyophilized **59** (0.4 g, 0.29 mmol) in dry DMF (7 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension of NaH (41 mg, 1.71 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (3 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xylene (114 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at rt for 12 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (1 mL), concentrated to dryness and the resulting residue purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  30:1 DCM-MeOH). Yield: 335 mg (77%). *R<sub>f</sub>* 0.23 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +137.5$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD):  $\delta$  7.30 (bs, 4 H, Ph), 5.28, 4.74 (2d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.3 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.27 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.6 Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.15, 4.51 (2d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 10.2 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.22, 5.18, 5.17, 5.13, 5.12 (5 d, 5 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.7 Hz, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.11 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.3 Hz, H-1<sup>II</sup>), 3.92 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.99-3.57 (m, 19 H, H-

5<sup>III-VII</sup>, H-6<sup>I-VII</sup>), 3.81 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.77 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.71, 3.68, 3.65, 3.64, 3.60, 3.55, 3.54, 3.51 (12s, 36 H, O2-Me, O3-Me), 3.66-3.53 (m, 5 H, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.59 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.55 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.4$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.63-3.48 (m, 5 H, H-3<sup>III-VII</sup>), 3.51 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.40-3.39 (7s, 21 H, O6-Me), 3.40 (dd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.21 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.20-3.15 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>).

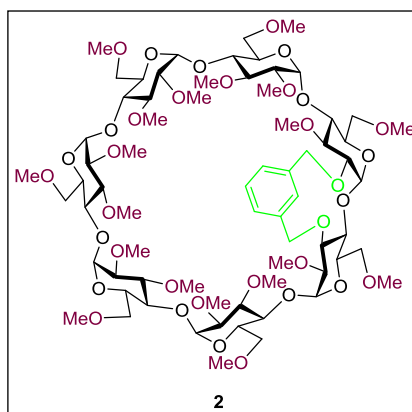
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  7.33 (bs, 4 H, Ph), 5.30 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.27, 5.23, 5.20-5.18 (6 d, 6 H,  $J_{1,2} = 3.2$ -3.6 Hz, H-1<sup>II-VII</sup>), 5.15, 4.71 (2d, 2 H,  $^2J_{H,H} = 9.3$  Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.98, 4.54 (2d, 2 H,  $^2J_{H,H} = 10.5$  Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 3.85-3.76 (m, 6 H, H-5<sup>II-VII</sup>), 3.83-3.56 (m, 14 H, H-6<sup>I-VII</sup>), 3.79 (m, 2 H, H-3<sup>II</sup>, H-5<sup>I</sup>), 3.71-3.65 (m, 5 H, H-4<sup>II,IV-VII</sup>), 3.68-3.56 (m, 5 H, H-3<sup>III-VII</sup>), 3.67 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.4$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.65 (t, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$  Hz, H-4<sup>III</sup>), 3.59, 3.55, 3.53-3.52, 3.48, 3.47, 3.46, 3.44-3.43 (12s, 36 H, O-2Me, O-3Me), 3.58 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.50 (dd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.33-3.32 (7s, 21 H, O-6Me), 3.33-3.24 (m, 6 H, H-2<sup>II-VII</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, MeOD):  $\delta$  137.3, 137.2, 130.4, 129.6, 127.8, 127.7 (Ph), 99.4 (C-1<sup>I</sup>), 98.7 (C-1<sup>II</sup>), 98.4, 98.1-97.9 (C-1<sup>III-VII</sup>), 82.2-81.7 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>), 80.5 (C-3<sup>II</sup>), 80.0 (C-2<sup>I</sup>), 79.7, 79.3, 79.2, 79.0, 78.5 (C-4<sup>I-VII</sup>), 75.3 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 70.8 (PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 71.6-70.5 (C-5<sup>I-VII</sup>, C-6<sup>I-VII</sup>), 60.9-60.3 (O2-Me), 58.0-57.5 (O3-Me, O6-Me).

ESI-MS:  $m/z$  1525.8 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd for C<sub>69</sub>H<sub>114</sub>O<sub>35</sub>: C 55.12, H 7.64. Found: C 54.91, H 7.559.





**2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*m*-Xylylene)-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-nonadeca-O-methylcyclomaltoheptaose (2).** A solution of freshly lyophilized **59** (0.4 g, 0.29 mmol) in dry DMF (7 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension of NaH (41 mg, 1.71 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (3 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xylene (114 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at rt for 12 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (1 mL), concentrated to dryness and the resulting residue purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  30:1 DCM-MeOH). Yield: 318 mg (73%). *R<sub>f</sub>* 0.22 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +124.0$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD):  $\delta$  8.02 (bs, 1 H, Ph<sub>H-2</sub>), 7.37 (t, 1 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, Ph<sub>H-5</sub>), 7.31 (d, 1 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, Ph<sub>H-6</sub>), 7.29 (d, 1 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, Ph<sub>H-4</sub>), 5.34, 5.14, 5.13, 5.09, 5.06 (5 d, 5 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.4 Hz, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.23, 4.34 (2d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 14.5 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.11 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 4.5 Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.81, 4.63 (2d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.8 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.28 (bd, 1H, *J*<sub>2,3</sub> = 4.2 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.98-3.50 (m, 18 H, H-5<sup>I,III-VII</sup>, H-6<sup>I,III-VII</sup>), 3.973 (m, 1 H, H-1<sup>I</sup>), 3.80 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.719 (m, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.71, 3.67, 3.65, 3.64, 3.63, 3.62, 3.56, 3.53, 3.52, 3.50, 3.49 (12s, 36 H, O2-Me, O3-Me), 3.63-3.45 (m, 6 H, H-4<sup>I,III-VII</sup>), 3.43 (m, 3 H, H-2<sup>I</sup>, H-6<sup>II</sup>), 3.59-3.48 (m,

6 H, H-3<sup>I,III-VII</sup>), 3.38, 3.37, 3.35, 3.34, 3.31, 3.21 (7s, 21 H, O6-Me), 3.19-3.12 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 1.973 (bs, 1 H, H-4<sup>II</sup>).

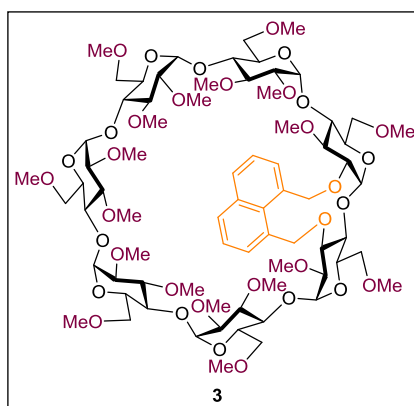
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.84 (bs, 1 H, Ph<sub>H-2</sub>), 7.40 (t, 1 H, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, Ph<sub>H-5</sub>), 7.35 (m, 2 H, Ph<sub>H-4,6</sub>), 5.34 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.8 Hz, H-1<sup>V</sup>), 5.20, 4.36 (2d, 2 H, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 14.3 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.19 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.6 Hz, H-1<sup>VI</sup>), 5.18 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, H-1<sup>III</sup>), 5.16 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.4 Hz, H-1<sup>IV</sup>), 5.13 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.3 Hz, H-1<sup>VII</sup>), 4.96 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.8 Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.79, 4.59 (2d, 2 H, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.27 (bd, 1H, J<sub>2,3</sub> = 4.0 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.86 (m, 2 H, H-1<sup>I</sup>, H-2<sup>II</sup>), 3.84 (m, 1 H, H-5<sup>V</sup>), 3.82 (m, 1 H, H-5<sup>VII</sup>), 3.80-3.35 (m, 14 H, H-3<sup>I</sup>, H-5<sup>I-III</sup>, H-6<sup>I,III-VII</sup>), 3.79 (m, 1 H, H-5<sup>IV</sup>), 3.75 (m, 1 H, H-5<sup>VI</sup>), 3.71 (m, 1 H, H-4<sup>VI</sup>), 3.67 (m, 1 H, H-4<sup>V</sup>), 3.65 (m, 1 H, H-4<sup>I</sup>), 3.64 (m, 3 H, H-3<sup>IV,VII</sup>, H-4<sup>IV</sup>), 3.63 (m, 2 H, H-3<sup>VI</sup>, H-4<sup>VII</sup>), 3.60, 3.57, 3.56, 3.54, 3.52, 3.49, 3.47, 3.45, 3.44-3.43 (12s, 36 H, O2-Me, O3-Me), 3.59 (m, 1 H, H-3<sup>V</sup>), 3.53 (m, 2 H, H-3<sup>III</sup>, H-4<sup>III</sup>), 3.43 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.38, 3.13 (2 bd, 2 H, H-6<sup>II</sup>), 3.30-3.29, 3.26, 3.23, 3.16 (7s, 21 H, O6-Me), 3.28 (m, 1 H, H-2<sup>V</sup>), 3.27 (m, 1 H, H-2<sup>VI</sup>), 3.26 (m, 1 H, H-2<sup>IV</sup>), 3.24 (m, 1 H, H-2<sup>VII</sup>), 3.22 (m, 1 H, H-2<sup>III</sup>), 1.65 (bs, 1 H, H-4<sup>II</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 139.8, 137.1 (Ph<sub>C-1,3</sub>), 130.6 (Ph<sub>C-2</sub>), 129.6, 127.8 (Ph<sub>C-4,6</sub>), 99.0 (C-1<sup>I</sup>), 98.0 (C-1<sup>III</sup>), 97.9 (C-1<sup>VI</sup>), 97.8 (C-1<sup>II</sup>), 97.3 (C-1<sup>VII</sup>), 97.0 (C-1<sup>IV</sup>), 96.3 (C-1<sup>V</sup>), 81.6 (C-3<sup>III</sup>), 81.5 (C-3<sup>VI</sup>), 81.1 (C-3<sup>V</sup>), 81.6-77.0 (C-2<sup>I-VII</sup>, C-3<sup>I,II</sup>, C-4<sup>II</sup>), 81.0 (C-3<sup>VII</sup>), 80.4 (C-3<sup>IV</sup>), 78.6 (C-4<sup>I</sup>), 78.1 (C-4<sup>III</sup>), 77.8 (C-4<sup>VII</sup>), 77.4 (C-4<sup>IV,V</sup>), 74.7 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 73.8 (C-4<sup>VI</sup>), 73.5 (PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 72.6 (C-6<sup>II</sup>), 71.1-69.4 (C-5<sup>I,II</sup>, C-6<sup>I,III-VII</sup>), 70.6 (C-5<sup>IV,V</sup>), 70.3 (C-5<sup>VII</sup>), 69.7 (C-5<sup>VI</sup>), 60.3-57.3 (OMe).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, MeOD): δ 140.7, 137.9 (Ph<sub>C-1,3</sub>), 130.2 (Ph<sub>C-2</sub>), 128.6, 126.2 (Ph<sub>C-4,6</sub>), 99.1 (C-1<sup>I</sup>), 99.0, 98.5, 98.4, 98.2, 97.5, 97.4 (C-1<sup>II-VII</sup>), 83.4-81.3 (C-2<sup>I,III-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>), 81.0, 80.6, 79.9, 79.6, 79.7, 76.5, (C-4<sup>I-VII</sup>), 77.7 (C-3<sup>II</sup>), 77.3 (C-2<sup>II</sup>), 74.6 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 73.1 (PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 72.2-70.2 (C-5<sup>I-VII</sup>, C-6<sup>I-VII</sup>), 60.7-59.9 (O2-Me), 58.3-57.0 (O3-Me, O6-Me).

ESI-MS: *m/z* 1525.8 [M + Na]<sup>+</sup>, 774.4 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd for  $C_{69}H_{114}O_{35}$ : C 55.12, H 7.64. Found: C 55.39, H 7.836.



**2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(1,8-Dimethylnaphthylene)-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-nonadeca-O-methylcycloaltoheptaose (3).** A solution of freshly lyophilized **59** (0.39 g, 0.27 mmol) in dry DMF (6 mL) under  $N_2$  atmosphere was added to a suspension of NaH (40 mg, 1.66 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (4 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of 1,8-dibromomethyl-naphthalene (131 mg, 0.42 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (2 mL) was added and the reaction mixture was stirred under  $N_2$  atmosphere at rt for 12 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (1.5 mL) and concentrated to dryness. The resulting residue was taken in DCM (10 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was separated and dried with  $Na_2SO_4$ , the solvent was removed under reduced pressure and the resulting syrup was purified by column chromatography (100:1  $\rightarrow$  20:1 EtOAc-EtOH). Yield: 234 mg (56%).  $R_f$  0.22 (20:1 EtOAc-EtOH).  $[\alpha]_D = +129.5$  ( $c$  1.0,  $CHCl_3$ ).

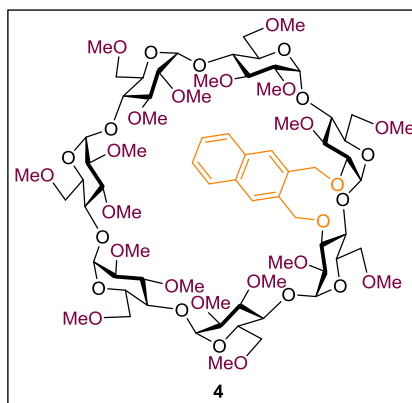
$^1H$  NMR (600 MHz, MeOD):  $\delta$  7.94 (2 dd, 2 H,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-4,5</sub>), 7.67 (dd, 1 H,  $^3J_{H,H} = 7.2$  Hz, Naphth<sub>H-7</sub>), 7.63 (dd, 1 H,  $^3J_{H,H} = 7.1$  Hz, Naphth<sub>H-2</sub>), 7.50 (dd, 1 H, Naphth<sub>H-6</sub>), 7.49 (dd, 1 H, Naphth<sub>H-3</sub>), 6.45, 4.63

(2d, 2 H,  $J_{\text{H,H}} = 9.1$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.84, 4.53 (2d, 2 H,  $J_{\text{H,H}} = 9.3$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.36 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.1$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.22, 5.19, 5.18, 5.17 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.9$  Hz, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.17 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.03 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 10.7$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.5$  Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.96 (ddd,  $J_{4,5} = 9.6$  Hz,  $J_{5,6b} = 1.2$  Hz, H-5<sup>II</sup>), 3.93-3.83 (m, 10 H, H-5<sup>III-VII</sup>, H-6a<sup>III-VII</sup>), 3.90 (m, 2 H, H-5<sup>I</sup>, H-6a<sup>I</sup>), 3.90 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.85 (t, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.76 (dd, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 3.75 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.4$  Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.74, 3.68, 3.67, 3.65, 3.63 (5 s, 15 H, O3<sup>III,VII</sup>-Me), 3.71 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 9.6$  Hz, H-6b<sup>I</sup>), 3.63 (m, 2 H, H-3<sup>I</sup>, H-4<sup>I</sup>), 3.57 (s, 3 H, O2<sup>II</sup>-Me), 3.66-3.50 (m, 10 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.56, 3.54, 3.53, 3.52, 3.49 (5 s, 15 H, O2<sup>III,VII</sup>-Me), 3.48 (s, 3 H, O3<sup>I</sup>-Me), 3.43 (s, 3 H, O6<sup>II</sup>-Me), 3.21 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.22, 3.20-3.15 (5 dd, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta$  135.6 (NaphthC-8), 133.8, 133.4, 133.3, 132.9 (NaphthC-1,2,7,9,10), 132.8, 130.4 (NaphthC-4,5), 124.9, 124.8 (NaphthC-3,6), 100.5 (C-1<sup>I</sup>), 98.4 (C-1<sup>II</sup>), 98.4, 98.0-97.9 (C-1<sup>III-VII</sup>), 83.8 (C-4<sup>II</sup>), 82.2-81.7 (C-2<sup>III-VII</sup>, C-4<sup>I,III-VII</sup>), 81.1 (C-3<sup>II</sup>), 81.0 (C-2<sup>II</sup>), 80.1 (C-2<sup>I</sup>), 79.6 (C-3<sup>I</sup>), 79.2-79.0 (C-3<sup>III-VII</sup>), 77.0 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.6-71.4 (C-6<sup>I,III-VII</sup>), 71.4 (C-6<sup>II</sup>), 71.1 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 71.3, 71.0-70.8 (C-5<sup>III-VII</sup>), 71.0 (C-5<sup>II</sup>), 70.7 (C-5<sup>I</sup>), 60.7 (O3<sup>I</sup>-Me), 60.4-60.3 (O3<sup>I,III-VII</sup>-Me), 58.6 (O2<sup>II</sup>-Me), 58.0-57.6 (O2<sup>III-VII</sup>-Me, O6<sup>I-VII</sup>-Me).

ESI-MS:  $m/z$  1575.8 [M + Na]<sup>+</sup>, 799.3 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd for C<sub>73</sub>H<sub>116</sub>O<sub>35</sub>: C 56.43, H 7.53. Found: C 56.53, H 7.62.



**2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(2,3-Dimethylnaphthylene)-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-nonadeca-O-methylcyclomaltoheptaose (4).** A solution of freshly lyophilized **59** (0.38 g, 0.27 mmol) in dry DMF (6 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension of NaH (39 mg, 1.6 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (4 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of 2,3-dibromomethyl-naphthalene<sup>12</sup> (127 mg, 0.40 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (2 mL) was added and the reaction mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at rt for 12 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (1.5 mL) and concentrated to dryness. The resulting residue was taken in DCM (10 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was separated and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), the solvent was removed under reduced pressure and the resulting syrup was purified by column chromatography (100:1 → 20:1 EtOAc-EtOH). Yield: 200 mg (48%). R<sub>f</sub> 0.24 (20:1 EtOAc-EtOH). [α]<sub>D</sub> = + 10.9 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

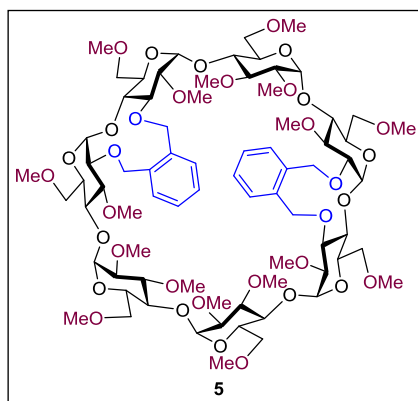
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOD): δ 7.87 (m, 2 H, Naphth<sub>H-7,10</sub>), 7.79 (s, 1 H, Naphth<sub>H-1</sub>), 7.78 (s, 1 H, Naphth<sub>H-4</sub>), 7.51 (m, 2 H, Naphth<sub>H-5,6</sub>), 5.44, 4.90 (2d, 2 H, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.32, 4.64 (2d, 2 H, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 10.0 Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.32 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.19, 5.17, 5.15 (4 d, 4 H, J<sub>1,2</sub> = 3.6 Hz, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.14 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, H-1<sup>II</sup>), 3.99-3.82 (m, 10 H, H-5<sup>III-VII</sup>, H-6a<sup>III-VII</sup>), 3.94 (ddd, J<sub>4,5</sub> = 9.9 Hz, J<sub>5,6a</sub> = 4.8 Hz, J<sub>5,6b</sub> = 1.7 Hz, H-5<sup>II</sup>), 3.92 (dd, 1 H,

$J_{6a,6b} = 10.7$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.5$  Hz, H-6a<sup>I</sup>), 3.83 (ddd, 1 H,  $J_{4,5} = 8.8$  Hz,  $J_{5,6b} = 1.3$  Hz, H-5<sup>I</sup>), 3.83 (t, 1 H,  $J_{2,3} = 9.6$  Hz,  $J_{3,4} = 8.6$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.77 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 10.8$  Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.73, 3.68, 3.65, 3.64 (5 s, 15 H, O3<sup>III,VII</sup>-Me), 3.72 (dd, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 3.68-3.51 (m, 10 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.67 (dd, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 3.61 (dd, 1 H,  $J_{3,4} = 9.7$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.60 (dd, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.59, 3.58, 3.56, 3.54, 3.52-3.51 (7 s, 21 H, O2<sup>II,III,VII</sup>-Me, O3<sup>I</sup>-Me), 3.53 (t, 1 H,  $J_{2,3} = 9.7$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.48 (dd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.23 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.20-3.15 (5 dd, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta$  135.0, 134.9 (Naphth<sub>C-2,3</sub>), 133.0, 133.1 (Naphth<sub>C-8,9</sub>), 129.5 (Naphth<sub>C-4</sub>), 128.7 (Naphth<sub>C-1</sub>), 127.2 (Naphth<sub>C-7,10</sub>), 126.1, 126.0 (Naphth<sub>C-5,6</sub>), 99.5 (C-1<sup>I</sup>), 98.7, 98.4, 98.1-97.9 (C-1<sup>II-VII</sup>), 82.2-81.7 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 80.9 (C-3<sup>II</sup>), 80.5, 80.0, 79.7, 79.3, 79.2, 78.6 (C-3<sup>I,III-VII</sup>), 79.1 (C-2<sup>I</sup>), 75.7 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.5-70.6 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>, C-5<sup>I-VII</sup>, C-6<sup>I-VII</sup>), 60.9-60.3 (O3<sup>I,III-VII</sup>-Me), 58.0-57.5 (O2<sup>II-VII</sup>-Me, O6<sup>I-VII</sup>-Me).

ESI-MS:  $m/z$  1575.8 [M + Na]<sup>+</sup>, 799.3 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd for C<sub>73</sub>H<sub>116</sub>O<sub>35</sub>: C 56.43, H 7.53. Found: C 56.12, H 7.26.



**2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>;2<sup>IV</sup>,3<sup>V</sup>-di-O-(*o*-Xylylene)-2<sup>II,III,V-VII</sup>,3<sup>I,III,IV,VI,VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-Heptadeca-O-methylcyclomaltoheptaose (5).** A solution of freshly lyophilized **60** (100 mg, 72.8  $\mu$ mol) in dry DMF (3 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension

of NaH (22.1 mg, 0.87 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (1 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xylene (57.6 mg, 0.22 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (1 mL) was added and the reaction mixture was stirred under  $N_2$  atmosphere at rt for 12 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (0.6 mL), concentrated to dryness and the resulting residue purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  30:1 DCM-MeOH). Yield: 81 mg (70%).  $R_f$  0.17 (30:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +121.0$  (c 1.0,  $CHCl_3$ ).

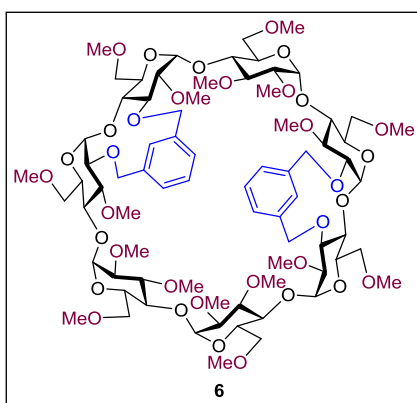
$^1H$  NMR (600 MHz, MeOD):  $\delta$  7.30-7.28 (m, 8 H, Ph), 5.26 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.0$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.25 (d, 1 H,  $^2J_{H,H} = 8.9$  Hz, PhCH<sub>2a</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.25 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.1$  Hz, H-1<sup>IV</sup>), 5.19 (d, 1 H,  $^2J_{H,H} = 9.1$  Hz, PhCH<sub>2a</sub>-O3<sup>V</sup>), 5.16 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1<sup>VII</sup>), 5.14 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1<sup>VI</sup>), 5.14 (d, 1 H,  $^2J_{H,H} = 10.4$  Hz, PhCH<sub>2a</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.13 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1<sup>III</sup>), 5.12 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1<sup>V</sup>), 5.10 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.07 (d, 1 H,  $^2J_{H,H} = 10.6$  Hz, PhCH<sub>2a</sub>-O2<sup>IV</sup>), 4.78 (d, 1 H, PhCH<sub>2b</sub>-O3<sup>V</sup>), 4.74 (d, 1 H, PhCH<sub>2b</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.63 (d, 1 H, PhCH<sub>2b</sub>-O2<sup>IV</sup>), 4.53 (d, 1 H, PhCH<sub>2b</sub>-O2<sup>I</sup>), 4.00 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 11.2$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.1$  Hz, H-6a<sup>III</sup>), 3.95 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.92 (m, 1 H, H-5<sup>V</sup>), 3.92 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 11.2$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.4$  Hz, H-6a<sup>IV</sup>), 3.89 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 10.9$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.5$  Hz, H-6a<sup>I</sup>), 3.86 (m, 2 H, H-5<sup>III,VII</sup>), 3.86 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 10.5$  Hz,  $J_{5,6a} = 3.8$  Hz, H-6a<sup>VI</sup>), 3.85 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 11.0$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.1$  Hz, H-6a<sup>VII</sup>), 3.85 (m, 1 H, H-5<sup>VII</sup>), 3.83 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.80 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$  Hz, H-3<sup>V</sup>), 3.80 (m, 1 H, H-5<sup>IV</sup>), 3.78 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.9$  Hz,  $J_{3,4} = 8.8$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.74 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 10.9$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.8$  Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.72 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 10.5$  Hz,  $J_{5,6a} = 4.6$  Hz, H-6a<sup>V</sup>), 3.71, 3.70, 3.67, 3.65, 3.60, 3.56, 3.54, 3.54, 3.53 (10s, 30 H, O2-Me, O3-Me), 3.70 (dd, 1 H,  $J_{5,6b} = 2.1$  Hz, H-6b<sup>II</sup>), 3.68 (dd, 1 H,  $J_{5,6b} = 1.4$  Hz, H-6b<sup>III</sup>), 3.68 (bd, 1 H, H-6b<sup>V</sup>), 3.67 (dd, 1 H,  $J_{5,6b} = 1.5$  Hz, H-6b<sup>VI</sup>), 3.65 (bd, 1 H, H-6b<sup>IV</sup>), 3.64 (bd, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 3.64 (bd, 1 H, H-6b<sup>VII</sup>), 3.64 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz, H-3<sup>III</sup>), 3.62 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz, H-3<sup>VI</sup>), 3.61 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$  Hz, H-3<sup>VII</sup>), 3.59 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$  Hz, H-3<sup>IV</sup>), 3.58 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.55 (dd, 1 H,  $J_{4,5} = 9.8$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.54 (t, 1 H,  $J_{4,5}$

= 9.1 Hz, H-4<sup>VI</sup>), 3.54 (t, 1 H,  $J_{4,5}$  = 9.0 Hz, H-4<sup>III</sup>), 3.53 (t, 1 H,  $J_{4,5}$  = 9.2 Hz, H-4<sup>VII</sup>), 3.53 (t, 1 H,  $J_{4,5}$  = 9.3 Hz, H-4<sup>V</sup>), 3.53 (t, 1 H,  $J_{4,5}$  = 9.2 Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.52 (t, 1 H,  $J_{4,5}$  = 9.2 Hz, H-4<sup>IV</sup>), 3.41, 3.40, 3.39 (7s, 21 H, O6-Me), 3.40 (dd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.39 (dd, 1 H, H-2<sup>IV</sup>), 3.22 (dd, 1 H, H-2<sup>V</sup>), 3.21 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.18 (dd, 1 H, H-2<sup>III</sup>), 3.18 (dd, 1 H, H-2<sup>VI</sup>), 3.17 (dd, 1 H, H-2<sup>VII</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (151.2 MHz, MeOD):  $\delta$  137.4-137.1, 130.6, 130.5, 129.7, 129.6, 127.9-127.8 (Ph), 99.4 (C-1<sup>I</sup>), 99.3 (C-1<sup>IV</sup>), 98.8 (C-1<sup>V</sup>), 98.6 (C-1<sup>II,III,VII</sup>), 98.2 (C-1<sup>VI</sup>), 82.3-81.4, 80.9 (C-4<sup>I-VII</sup>, C-2<sup>II,III,V-VII</sup>), 81.1 (C-3<sup>V</sup>), 81.0 (C-3<sup>II</sup>), 80.8 (C-3<sup>III</sup>), 80.7 (C-3<sup>VII</sup>), 80.1, 79.8, 79.6 (C-3<sup>I,IV,VI</sup>), 79.1 (C-2<sup>I</sup>), 78.8 (C-2<sup>IV</sup>), 75.2 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 74.9 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>V</sup>), 71.7, 71.6 (C-6<sup>II,V</sup>), 71.4-70.6 (C-5<sup>I,III,IV,VI,VII</sup>, C-6<sup>I,III,IV,VI,VII</sup>), 71.1 (PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>IV</sup>), 70.9 (PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 70.5, 70.4 (C-5<sup>II,V</sup>), 60.9, 60.7, 60.4 (O3-Me), 57.9-57.6, 57.3, 57.2 (O2-Me, O6-Me).

ESI-MS:  $m/z$  1599.7 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>75</sub>H<sub>116</sub>O<sub>35</sub>: C 57.10, H 7.41. Found: C 57.37, H 7.70.



**2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>;2<sup>IV</sup>,3<sup>V</sup>-di-O-(*m*-Xylylene)-2<sup>II,III,V-VII</sup>,3<sup>I,III,IV,VI,VII</sup>,6<sup>I-VII</sup>-Heptadeca-O-methylcyclomaltoheptaose (6).** A solution of freshly lyophilized **60** (100 mg, 72.8  $\mu$ mol) in dry DMF (3 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension of NaH (22.1 mg, 0.87 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (1 mL) and the mixture was



stirred at rt for 30 min. Then, a solution of  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xylene (57.6 mg, 0.22 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (1 mL) was added and the reaction mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at rt for 12 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (0.6 mL), concentrated to dryness and the resulting residue purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  30:1 DCM-MeOH). Yield: 94 mg (82%). *R*<sub>f</sub> 0.21 (30:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +112.7$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

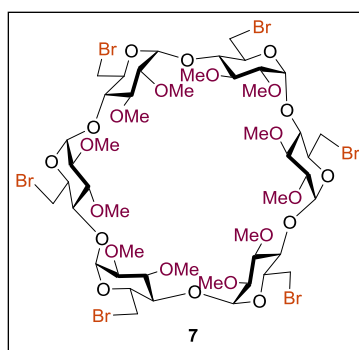
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  7.84, 7.83 (2 bs, 2 H, Ph<sub>H-2,2'</sub>), 7.40 (t, 2 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, Ph<sub>H-5,5'</sub>), 7.34 (2 bd, 4 H, Ph<sub>H-4,6,4',6'</sub>), 5.20, 4.36 (2d, 4 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 14.2 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I,IV</sup>), 5.17 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, H-1<sup>V</sup>), 5.15 (bd, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.3 Hz, H-1<sup>III</sup>), 5.13 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.7 Hz, H-1<sup>VII</sup>), 5.02 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 4.3 Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.96 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 5.4 Hz, H-1<sup>V</sup>), 4.79, 4.58 (2d, 4 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 11.7 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II,V</sup>), 4.28 (d, 1 H, H-3<sup>II</sup>), 4.27 (d, 1 H, H-3<sup>V</sup>), 3.88 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 3.8 Hz, H-2<sup>V</sup>), 3.87 (bs, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.83 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 2.4 Hz, H-1<sup>IV</sup>), 3.82 (bs, 1 H, H-1<sup>I</sup>), 3.81 (dd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.0 Hz, *J*<sub>5,6a</sub> = 3.9 Hz, H-6a<sup>VII</sup>), 3.76 (m, 1 H, H-5<sup>VI</sup>), 3.73 (m, 2 H, H-5<sup>III,VII</sup>), 3.69 (dd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.2 Hz, *J*<sub>5,6a</sub> = 3.7 Hz, H-6a<sup>IV</sup>), 3.67 (dd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.3 Hz, *J*<sub>5,6a</sub> = 3.4 Hz, H-6a<sup>I</sup>), 3.63 (dd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.6 Hz, *J*<sub>5,6a</sub> = 5.2 Hz, H-6a<sup>VI</sup>), 3.61 (m, 2 H, H-3<sup>VII</sup>, H-4<sup>VII</sup>), 3.60, 3.58, 3.54, 3.53, 3.52 (5s, 15 H, O3<sup>I,III,IV,VI,VII</sup>-Me), 3.60 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.58 (m, 1 H, H-6a<sup>III</sup>), 3.57 (bt, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = *J*<sub>5,6b</sub> = 5.6 Hz, H-5<sup>V</sup>), 3.56-3.55 (m, 2 H, H-5<sup>I,IV</sup>), 3.57 (t, 1 H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 9.3 Hz, H-4<sup>VI</sup>), 3.56 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.5 Hz, H-2<sup>IV</sup>), 3.55-3.50 (m, 6 H, H-3<sup>I,III,IV</sup>, H-4<sup>I,III,IV</sup>), 3.53 (bd, 1 H, H-6b<sup>VI</sup>), 3.50 (t, 1 H, H-3<sup>VI</sup>), 3.50 (m, 1 H, H-6b<sup>III</sup>), 3.50 (bd, 1 H, H-6b<sup>VII</sup>), 3.49 (s, 3 H, O2<sup>V</sup>-Me), 3.48 (s, 3 H, O2<sup>II</sup>-Me), 3.46 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.46 (s, 3 H, O2<sup>VII</sup>-Me), 3.45 (s, 3 H, O2<sup>III</sup>-Me), 3.44 (s, 3 H, O2<sup>VI</sup>-Me), 3.38 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.2 Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.37 (bd, 1 H, H-6b<sup>IV</sup>), 3.36 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.0 Hz, H-6a<sup>V</sup>), 3.34 (bd, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 3.27, 3.26, 3.25, 3.22, 3.21 (5s, 15 H, O6<sup>I,III,IV,VI,VII</sup>-Me), 3.21 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.7 Hz, H-2<sup>III</sup>), 3.21 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.6 Hz, H-2<sup>VII</sup>), 3.21 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.3 Hz, H-2<sup>VI</sup>), 3.21 (bd, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 3.14, 3.13 (2s, 6 H, O6<sup>II,V</sup>-Me), 3.12 (dd, 1 H, H-6b<sup>V</sup>), 1.76 (bs, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 1.62 (bs, 1 H, H-4<sup>V</sup>).

$^{13}\text{C}$  NMR (151.2 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  140.0, 139.8, 137.0 ( $\text{Ph}_{\text{C-1,3}}$ ), 130.4 ( $\text{Ph}_{\text{C-2}}$ ), 129.5 ( $\text{Ph}_{\text{C-5}}$ ), 129.5, 127.7 ( $\text{Ph}_{\text{C-4,6}}$ ), 98.9 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ,  $\text{C-1}^{\text{IV}}$ ), 98.7 ( $\text{C-1}^{\text{III}}$ ), 98.5 ( $\text{C-1}^{\text{VII}}$ ), 98.1 ( $\text{C-1}^{\text{VI}}$ ), 97.8 ( $\text{C-1}^{\text{V}}$ ), 96.9 ( $\text{C-1}^{\text{II}}$ ), 81.9 ( $\text{C-4}^{\text{VI}}$ ), 81.9-80.2 ( $\text{C-2}^{\text{I,IV}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I,IV}}$ ), 81.6 ( $\text{C-4}^{\text{III}}$ ), 81.2 ( $\text{C-4}^{\text{VII}}$ ), 81.0 ( $\text{C-4}^{\text{II}}$ ), 80.4 ( $\text{C-2}^{\text{III,VI,VII}}$ ), 78.8 ( $\text{C-3}^{\text{I,IV}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{V}}$ ), 78.0 ( $\text{C-3}^{\text{VII}}$ ), 77.6 ( $\text{C-3}^{\text{VI}}$ ), 76.1 ( $\text{C-3}^{\text{III}}$ ), 75.8 ( $\text{C-2}^{\text{II,V}}$ ), 75.3 ( $\text{C-3}^{\text{II,V}}$ ), 74.6 ( $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II,V}}$ ), 73.2 ( $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I,IV}}$ ), 72.1 ( $\text{C-6}^{\text{II,V}}$ ), 72.1, 70.9 ( $\text{C-5}^{\text{I,IV}}$ ), 70.9 ( $\text{C-6}^{\text{III}}$ ), 70.6 ( $\text{C-6}^{\text{I,VI}}$ ), 70.5 ( $\text{C-6}^{\text{IV,VII}}$ ), 70.1, 69.9 ( $\text{C-5}^{\text{VI,VII}}$ ), 69.6 ( $\text{C-5}^{\text{III,III,V}}$ ), 60.3, 60.0, 59.9, 59.1 ( $\text{O3}^{\text{I,III,IV,VI,VII}}$ -Me), 58.4-58.0 ( $\text{O2}^{\text{III,VI,VII}}$ -Me,  $\text{O6}^{\text{I-VII}}$ -Me), 57.5, 57.1 ( $\text{O2}^{\text{II,V}}$ -Me).

ESI-MS:  $m/z$  1599.6 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , 811.3 [ $\text{M} + 2 \text{Na}$ ] $^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{75}\text{H}_{116}\text{O}_{35}$ : C 57.10, H 7.41. Found: C 57.29, H 7.64.

***Facially differentiated  $\alpha$ -cyclodextrin derivatives.***



**Hexakis(6-bromo-6-deoxy-2,3-di-O-methyl)cyclomaltohexaose (7).** To a solution of TPP (2.44 g, 9.32 mmol, 1.1 eq.) in DCM, under  $\text{N}_2$  atmosphere at  $0^\circ\text{C}$ , a solution of  $\text{Br}_2$  (0.46 mL, 9.23 mmol, 1.1 eq.) in DCM (44 mL) was slowly added. Then, the reaction mixture was warmed up to rt and a solution of **70** (2.63 g, 1.44 mmol) was then added. The reaction mixture was stirred for 24 h at rt under  $\text{N}_2$  atmosphere, washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  (44 mL), brine (44 mL), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrated, and concentrated under reduced pressure. The

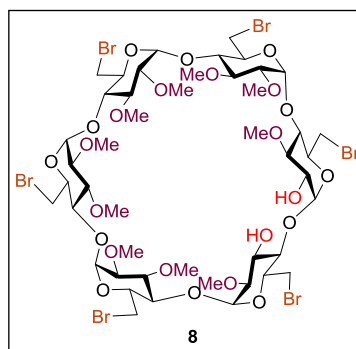
resulting residue was purified by column chromatography (1:2  $\rightarrow$  1:1 EtOAc-petroleum ether). Yield 1.68 g (77%).  $R_f$  0.52 (1:1 EtOAc-petroleum ether).  $[\alpha]_D = +85.1$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.15 (d, 6 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz, H-1), 3.96 (m, 12 H, H-5, H-6a), 3.84 (d, 6 H,  $J_{6a,6b} = 9.9$  Hz, H-6b), 3.66 (s, 18 H, OMe), 3.57 (t, 6 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$  Hz, H-3), 3.54 (s, 18 H, OMe), 3.53 (t, 6 H,  $J_{4,5} = 9.0$  Hz, H-4), 3.21 (dd, 6 H, H-2).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  99.5 (C-1), 84.4 (C-4), 81.7 (C-2), 80.9 (C-3), 71.3 (C-5), 61.8, 58.3 (OMe), 34.1 (C-6).

ESI-MS:  $m/z$  1540.6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{Br}_6\text{O}_{24}$ : C 37.97, H 5.18. Found: C 37.94, H 5.50.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexabromo-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-**

**methylcyclomaltohexaose (8).** To a stirred solution of **7** (2.00 g, 1.32 mmol) in toluene (47 mL). under  $\text{N}_2$  atmosphere at 0 °C, a solution of DIBAL-H (1 M in toluene, 11.85 mL, 11.85 mmol, 9.0 eq.) was added. The reaction mixture was further stirred at rt for 24 h and then, was quenched by addition of 1 M aq HCl until pH 1 at 0 °C. The reaction mixture was stirred vigorously to dissolve aluminium salts in an ice bath, the organic layer was decanted and the aqueous phase was extracted with DCM (3 x 100 mL). The combined organic layers were

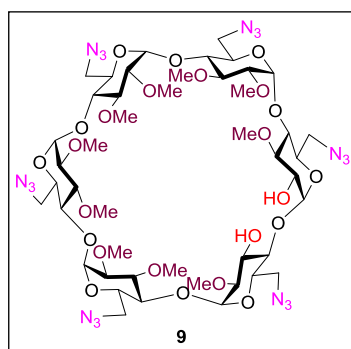
washed with brine (100 mL), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The resulting residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  20:1 DCM-MeOH). Yield 0.92 g (47%). Unreacted **7** (0.96 g, 48%) was also recovered.  $R_f$  0.41 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +92.8$  (c 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.19 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.17, 5.14-5.12 (4 d, 4 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>III-VI</sup>), 5.13 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.2$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 4.13 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 4.00 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.02-3.95 (m, 10 H, H-5<sup>I,III-VI</sup>, H-6a<sup>I,III-VI</sup>), 3.95-3.79 (m, 5 H, H-6b<sup>I,III-VI</sup>), 3.82 (m, 2 H, H-6<sup>II</sup>), 3.75 (s, 3 H, OMe), 3.66 (1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.66-3.64 (4 s, 12 H, OMe), 3.60 (t, 5 H,  $J_{3,4} = 8.8$  Hz, H-3<sup>I,III-VI</sup>), 3.60 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.58-3.50 (m, 5 H, H-4<sup>I,III-VI</sup>), 3.56-3.53 (5 s, 15 H, OMe), 3.26 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.24-3.19 (m, 4 H, H-2<sup>III-VI</sup>), 2.43 (bs, 2 H, OH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  101.8 (C-1<sup>I</sup>), 99.7-99.0 (C-1<sup>II-VI</sup>), 84.8-84.2 (C-4<sup>I-VI</sup>), 82.3-80.4 (C-2<sup>II-VI</sup>, C-3<sup>I,III-VI</sup>), 72.8 (C-2<sup>I</sup>), 72.3-70.4 (C-5<sup>I-VI</sup>), 71.6 (C-3<sup>II</sup>), 62.4 (OMe), 61.9-61.8 (OMe), 58.5-57.9 (OMe), 34.2-34.0, 33.1 (C-6<sup>I-VI</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1512.7  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{Br}_6\text{O}_{24}$ : C 37.07, H 5.00. Found: C 37.14, H 5.20.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexaazido-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methylcyclomaltohexaose (9).** To a solution of **8** (0.92 g, 0.62 mmol) in DMF (42 mL)  $\text{NaN}_3$  (0.72 g, 11.15 mmol, 3.0 eq.) was added. The reaction mixture was

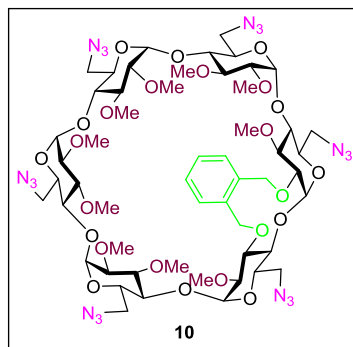
stirred at 60 °C for 16 h and then the solvent was evaporated under reduced pressure, the residue was taken into DCM (65 mL) and washed with water (40 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and the solvent removed under vacuum to furnish **9**. Yield 782 mg (quantitative). *R<sub>f</sub>* 0.41 (20:1 DCM-MeOH). [α]<sub>D</sub> = + 112.0 (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.09 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.2 Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.05, 5.04, 5.01 (4 d, 5 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.4 Hz, H-1<sup>III-VI</sup>), 5.02 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.5 Hz, H-1<sup>I</sup>), 4.08 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.3 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.88-3.77 (m, 10 H, H-5<sup>II-VI</sup>, H-6a<sup>II-VI</sup>), 3.86-3.76 (m, 5 H, H-5<sup>II-VI</sup>), 3.84 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.74 (s, 3 H, OMe), 3.73 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 11.1 Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.71-3.52 (m, 5 H, H-6b<sup>I,III-VI</sup>), 3.65, 3.64 (2 s, 6 H, OMe), 3.55 (m, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 3.63 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.4 Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.63 (2 s, 6 H, OMe), 3.58-3.43 (m, 10 H, H-4<sup>I,III-VI</sup>, H-3<sup>I,III-VI</sup>), 3.54, 3.53 (2 s, 6 H, OMe), 3.53 (t, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = 9.3 Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.52 (3 s, 9 H, OMe), 3.23 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.21-3.16 (m, 4 H, H-2<sup>III-VI</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 102.0 (C-1<sup>I</sup>), 99.9-99.2 (C-1<sup>II-VI</sup>), 83.7-83.1 (C-4<sup>I-VI</sup>), 82.4-80.4 (C-2<sup>II-VI</sup>, C-3<sup>I,III-VI</sup>), 72.9 (C-2<sup>I</sup>), 72.3-70.1 (C-5<sup>I-VI</sup>, C-3<sup>II</sup>), 64.4, 61.8-61.7, 58.3-57.8 (OMe), 51.4-52.0 (C-6<sup>I-VI</sup>).

ESI-MS: *m/z* 1285.4 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>N<sub>18</sub>O<sub>24</sub>: C 43.74, H 5.91, N 19.96. Found: C 44.02, H 6.07, N 19.61.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexaazido-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*o*-xylylene)-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methylcyclomaltohexaose (10).** A solution of freshly lyophilized **9** (0.33 g, 0.26 mmol) in dry DMF (15 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension of NaH (39.7 mg, 1.57 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (7 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xylene (0.14 g, 0.52 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (5 mL) was added and the reaction mixture was further stirred at rt for 16 h. The reaction was quenched by addition of 1 M HCl (7 mL) and concentrated. The residue was taken into DCM (65 mL) and washed with water (40 mL). The organic layer was dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and the solvent removed under vacuum and the residue purified by column chromatography (100:1  $\rightarrow$  50:1 EtOAc-MeOH). Yield 266 mg (74%). *R*<sub>f</sub> 0.48 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +118.8$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

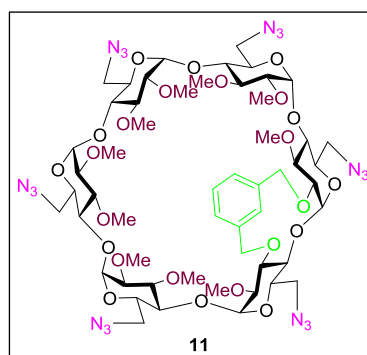
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.31-7.24 (m, 4 H, Ph), 5.36, 4.68 (2 d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.31 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.27, 4.40 (2 d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.60 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.08-5.01 (4 d, 4 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.3 Hz, H-1<sup>III-VI</sup>), 5.04 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 2.9 Hz, H-1<sup>II</sup>), 3.92 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.87-3.77 (m, 4 H, H-5<sup>III-VI</sup>), 3.84 (m, 2 H, H-5<sup>I</sup>, H-6a<sup>I</sup>), 3.82 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 12.6 Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.77 (t, 1 H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>2,3</sub> = 9.5 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.74 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.1 Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.72 (s, 3 H, OMe), 3.72 (dd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 12.3 Hz, *J*<sub>5,6b</sub> = 4.2 Hz, H-6b<sup>I</sup>), 3.67 (s, 3 H, OMe), 3.67-3.59 (m, 8 H, H-6a<sup>III-VI</sup>, H-6b<sup>III-VI</sup>), 3.64 (s, 3 H, OMe), 3.63 (s, 3 H, OMe), 3.61 (t, 1 H, *J*<sub>3,4</sub> = 9.1

Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.59 (s, 3 H, OMe), 3.56 (s, 3 H, OMe), 3.54 (s, 6 H, OMe), 3.54 (dd, 1 H,  $J_{5,6b} = 5.8$  Hz, H-6b<sup>II</sup>), 3.54 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.54-3.43 (m, 8 H, H-3<sup>III-VI</sup>, H-4<sup>III-VI</sup>), 3.52 (s, 3 H, OMe), 3.50 (s, 3 H, OMe), 3.49 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.26 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.22-3.17 (4 d, 4 H, H-2<sup>III-VI</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  136.8-128.0 (Ph), 99.9-99.3 (C-1<sup>I-VI</sup>), 84.2-83.1 (C-4<sup>I-VI</sup>), 82.0-81.4 (C-2<sup>II-VI</sup>), 81.1-80.7 (C-3<sup>I,III-VI</sup>), 80.2-79.5 (C-3<sup>II</sup>, C-2<sup>I</sup>), 76.8 (Ph-CH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.5-71.0 (C-5<sup>I,III-VI</sup>, Ph-CH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 70.7 (C-5<sup>II</sup>), 62.3-61.7, 58.4-57.8 (OMe), 51.9 (C-6<sup>I-VI</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1387.4 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>54</sub>H<sub>80</sub>N<sub>18</sub>O<sub>24</sub>: C 47.50, H 5.91, N 18.47. Found: C 47.77, H 6.28, N 18.16.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexaazido-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*m*-xylylene)-2<sup>I-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-**

**methylcyclomaltohexaose (11).** A solution of freshly lyophilized **9** (0.29 g, 0.23 mmol) in dry DMF (12 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension of NaH (35.2 mg, 1.39 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (7 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xylene (91.9 mg, 0.35 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at rt for 16 h. The reaction was quenched by addition of 1 M HCl until neutral pH (ca. 5 mL) and concentrated to dryness. The residue was taken in

Et<sub>2</sub>O (12 mL) and the solution was then washed with H<sub>2</sub>O (12 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrated and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting residue was purified by column chromatography (100:1 → 50:1 DCM-MeOH). Yield 166 mg (52%). *R*<sub>f</sub> 0.28 (50:1 DCM-MeOH). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 94.0 (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOD):  $\delta$  8.03 (bs, 1 H, Ph<sub>H-2</sub>), 7.42 (t, 1 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, Ph<sub>H-5</sub>), 7.38 (bd, 1 H, Ph<sub>H-4</sub>), 7.34 (bd, 1 H, Ph<sub>H-6</sub>), 5.25, 4.38 (2 d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 14.1 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.15 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.8 Hz, H-1<sup>VI</sup>), 5.14 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 5.3 Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.13 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.7 Hz, H-1<sup>V</sup>), 5.11 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.2 Hz, H-1<sup>IV</sup>), 5.10 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.1 Hz, H-1<sup>III</sup>), 4.88, 4.65 (2 d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 10.8 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.33 (d, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 3.9 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.98 (ddd, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = 1.9 Hz, *J*<sub>5,6b</sub> = 7.0 Hz, H-5<sup>III</sup>), 3.91 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.1 Hz, H-1<sup>I</sup>), 3.92 (m, 1 H, H-6a<sup>IV</sup>), 3.88 (m, 1 H, H-5<sup>IV</sup>), 3.86 (m, 1 H, H-6a<sup>I</sup>), 3.86 (m, 1 H, H-5<sup>III</sup>), 3.82 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.80 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 13.3 Hz, H-6a<sup>III</sup>), 3.77 (m, 1 H, H-6a<sup>V</sup>), 3.75 (bt, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = 7.7 Hz, H-5<sup>II</sup>), 3.77 (m, 1 H, H-5<sup>VI</sup>), 3.71 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.71 (s, 3 H, OMe), 3.68 (m, 1 H, H-6a<sup>VI</sup>), 3.67 (m, 1 H, H-6b<sup>V</sup>), 3.66 (s, 3 H, OMe), 3.65 (m, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 3.65 (2 s, 6 H, OMe), 3.64 (s, 3 H, OMe), 3.63 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.4 Hz, H-3<sup>III</sup>), 3.63 (m, 1 H, H-6b<sup>IV</sup>), 3.61 (s, 3 H, OMe), 3.57 (s, 3 H, OMe), 3.55 (m, 1 H, H-4<sup>IV</sup>), 3.53 (m, 1 H, H-3<sup>I</sup>), 3.53 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.7 Hz, H-3<sup>VI</sup>), 3.53 (t, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = 9.7 Hz, H-4<sup>VI</sup>), 3.53 (s, 3 H, OMe), 3.51 (m, 1 H, H-4<sup>V</sup>), 3.51 (m, 1 H, H-3<sup>IV</sup>), 3.51 (s, 3 H, OMe), 3.49 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 13.2 Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.48 (t, 1 H, H-4<sup>III</sup>), 3.48 (s, 3 H, OMe), 3.46 (m, 1 H, H-3<sup>V</sup>), 3.43 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.42 (m, 1 H, H-6b<sup>VI</sup>), 3.42 (dd, 1 H, H-6b<sup>III</sup>), 3.41 (t, 1 H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 3.7 Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.19 (dd, 1 H, H-2<sup>III</sup>), 3.18 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.7 Hz, H-2<sup>V</sup>), 3.16 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.6 Hz, H-2<sup>IV</sup>), 3.16 (dd, 1 H, H-2<sup>VI</sup>), 3.10 (dd, 1 H, *J*<sub>5,6b</sub> = 6.2 Hz, H-6b<sup>II</sup>), 1.81 (d, 1 H, H-4<sup>II</sup>).

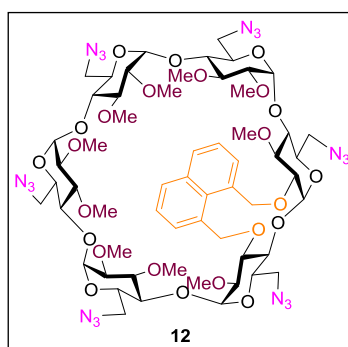
<sup>13</sup>C NMR (125.7, MHz CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  140.0-138.3 (Ph<sub>C-1,3</sub>), 130.3 (Ph<sub>C-2</sub>), 128.9 (Ph<sub>C-4,5</sub>), 126.6 (Ph<sub>C-6</sub>), 99.3 (C-1<sup>V</sup>), 99.2 (C-1<sup>VI</sup>), 99.1 (C-1<sup>IV</sup>), 99.0 (C-1<sup>I</sup>), 98.3 (C-1<sup>III</sup>), 97.0 (C-1<sup>II</sup>), 83.5 (C-2<sup>I</sup>), 82.8 (C-4<sup>V</sup>), 82.8 (C-4<sup>IV</sup>), 82.6 (C-3<sup>III</sup>), 82.6 (C-4<sup>I</sup>),



81.7 (C-3<sup>I</sup>), 81.6 (C-2<sup>V</sup>), 81.6 (C-2<sup>IV</sup>), 81.6 (C-2<sup>VI</sup>), 81.6 (C-2<sup>III</sup>), 81.6 (C-3<sup>VI</sup>), 81.3 (C-3<sup>V</sup>), 81.3 (C-3<sup>IV</sup>), 81.3 (C-4<sup>VI</sup>), 80.0 (C-4<sup>II</sup>), 78.1 (C-4<sup>III</sup>), 76.8 (C-2<sup>II</sup>), 75.6 (C-3<sup>II</sup>), 74.6 (Ph-CH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 72.6 (Ph-CH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 71.6 (C-5<sup>VI</sup>), 71.3 (C-5<sup>II</sup>), 71.2 (C-5<sup>IV</sup>), 70.9 (C-5<sup>V</sup>), 70.6 (C-5<sup>I</sup>), 70.1 (C-5<sup>III</sup>), 60.9-56.4 (OMe), 53.3 (C-6<sup>II</sup>), 52.3 (C-6<sup>VI</sup>), 52.2 (C-6<sup>IV</sup>), 51.8 (C-6<sup>I</sup>), 51.6 (C-6<sup>III</sup>), 51.5 (C-6<sup>V</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1387.3 [M + Na]<sup>+</sup>, 1403.3 [M + K]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>54</sub>H<sub>80</sub>N<sub>18</sub>O<sub>24</sub>: C 47.50, H 5.91, N 18.47. Found: C 47.72, H 6.11, N 18.22.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexaazido-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(1,8-dimethylnaphthylene)-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methylcyclomaltohexaose (12).** A solution of freshly lyophilized **9** (0.25 g, 0.20 mmol) in dry DMF (10 mL) under N<sub>2</sub> atmosphere was added to a suspension of NaH (30.0 mg, 1.19 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (5 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of 1,8-bis(bromomethyl)naphthalene (93.2 mg, 0.30 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at rt for 16 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl until neutral pH (ca. 2 mL) and concentrated to dryness. The residue was taken in Et<sub>2</sub>O (10 mL) and the solution was washed with H<sub>2</sub>O (10 mL), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrated and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting residue was

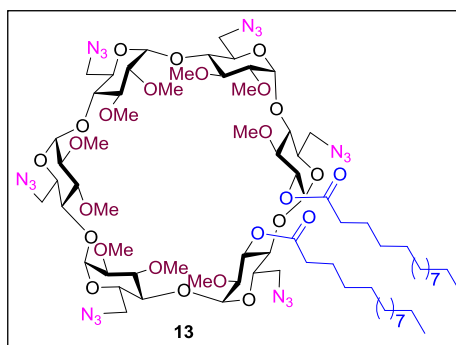
purified by column chromatography (100:1  $\rightarrow$  50:1 DCM-MeOH). Yield 216 mg (77%).  $R_f$  0.36 (50:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +144.8$  ( $c$  0.5,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.91 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-5</sub>), 7.89 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-4</sub>), 7.66 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-7</sub>), 7.62 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-2</sub>), 7.50 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$  Hz, Naphth<sub>H-6</sub>), 7.47 (t, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$  Hz, Naphth<sub>H-3</sub>), 6.25, 4.59 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.0$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.81, 4.42 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.0$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.33 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.08 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.1$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.08-5.03 (4 d, 4 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>III-VI</sup>), 3.98-3.68 (3 m, 3 H, H-5<sup>II</sup>, H-6a<sup>II</sup>, H-6b<sup>II</sup>), 3.98-3.44 (m, 10 H, H-3<sup>I,III-VI</sup>, H-4<sup>I,III-VI</sup>), 3.98-3.73 (m, 4 H, H-5<sup>III-VI</sup>), 3.97-3.55 (4 dd, 8 H,  $J_{5,6} = 4.8$  Hz,  $J_{6a,6b} = 13.0$  Hz, H-6a<sup>III-VI</sup>, H-6b<sup>III-VI</sup>), 3.93 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.90 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.79 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 10.1$  Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.78 (s, 3 H, OMe), 3.71 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 10.0$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.71 (m, 2 H, H-6a<sup>I</sup>, H-6b<sup>I</sup>), 3.68 (s, 3 H, OMe), 3.67 (t, 1 H,  $J_{3,4} = 9.5$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.65 (s, 3 H, OMe), 3.63 (s, 3 H, OMe), 3.62 (s, 3 H, OMe), 3.57 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.57 (s, 3 H, OMe), 3.54 (s, 3 H, OMe), 3.52 (2 s, 6 H, OMe), 3.51 (s, 3 H, OMe), 3.29 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.26-3.16 (4 dd, 4 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-2<sup>III-VI</sup>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  135.4, 133.9, 133.3, 132.7 (Naphth<sub>C-1,8,9,10</sub>), 133.6 (Naphth<sub>C-2,7</sub>), 130.7 (Naphth<sub>C-4,5</sub>), 125.2 (Naphth<sub>C-3,6</sub>), 100.7 (C-1<sup>I</sup>), 100.2-99.5 (C-1<sup>II-VI</sup>), 85.2 (C-2<sup>I</sup>), 83.9-82.8 (C-4<sup>I-VI</sup>), 82.2-80.2 (C-2<sup>II-VI</sup>, C-3<sup>I-VI</sup>), 71.7-70.8 (C-5<sup>I-VI</sup>, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 62.2-61.6, 59.0-58.0 (OMe), 52.0 (C-6<sup>I-VI</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1437.4  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{58}\text{H}_{82}\text{N}_{18}\text{O}_{24}$ : C 49.22, H 5.84, N 17.81. Found: C 49.57, H 6.16, N 17.49.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexaazido-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-di-O-(myristoyl)-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methylcyclomaltohexaose (13).** A solution of **9** (0.25 g, 0.20 mmol), DMAP (48 mg, 0.40 mmol, 1.0 eq.) and myristic anhydride (0.73 g, 1.58 mmol, 4.0 eq.) in DMF (19 mL) was stirred at 0 °C for 1h. The mixture was stirred at rt for 48 h. Then, the solvent was removed under vacuum and the resulting residue was dissolved in 95:5 DCM-MeOH (100 mL) and was refluxed for 1 h. The solution was then washed with H<sub>2</sub>O (2 x 50 mL), aqueous 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 x 50 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (2 x 50 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrated and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (1:2 → 1:1 EtOAc-petroleum ether). Yield 0.33 g (quant). *R<sub>f</sub>* 0.46 (1:2 EtOAc-petroleum ether). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 121.6 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

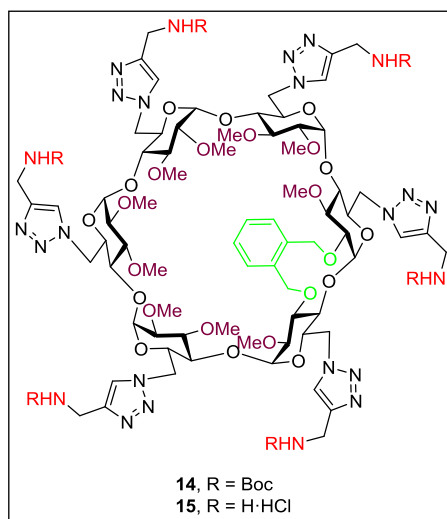
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  5.44 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.7$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 5.13 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.05, 5.03, 5.02, 5.01 (4 d, 4 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz, H-1<sup>III-VI</sup>), 4.93 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.0$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 4.68 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 10.2$  Hz, H-2<sup>I</sup>), 4.00-3.72 (m, 4 H, H-5<sup>III-VI</sup>), 3.94 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.92-3.40 (m, 8 H, H-6a<sup>III-VI</sup>, H-6b<sup>III-VI</sup>), 3.86 (m, 1 H, H-6a<sup>II</sup>), 3.85 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.82 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.8$  Hz, H-6a<sup>I</sup>), 3.77-3.32 (4 t, 4 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$  Hz, H-3<sup>III-VI</sup>), 3.72 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.2$  Hz, H-6b<sup>II</sup>), 3.70 (s, 3 H, OMe), 3.67 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.7$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.65, 3.62, 3.58 (3 s, 9 H, OMe), 3.58 (t, 1 H,  $J_{3,4} = 10.2$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.54, 3.53, 3.50 (5 s, 15 H, OMe), 3.50-3.32 (4 t, 4 H,  $J_{4,5} = 9.6$  Hz, H-4<sup>III-VI</sup>), 3.49 (dd, 1 H,  $J_{5,6} = 6.2$  Hz, H-6b<sup>I</sup>), 3.46 (s, 3 H, OMe), 3.38

(t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.8$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.22 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.21-3.12 (4 dd, 4 H, H-2<sup>III-VI</sup>), 2.46-2.34 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-2), 1.78-1.53 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-3), 1.42-1.20 (m, 20 H, CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 1.00-0.85 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>-14).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173.2 (CO), 100.4-99.4 (C-1<sup>III-VI</sup>), 99.5 (C-1<sup>II</sup>), 97.7 (C-1<sup>I</sup>), 83.9-81.7 (C-4<sup>I-VI</sup>), 83.1-78.8 (C-2<sup>II-VI</sup>), 80.9-78.8 (C-3<sup>I,III-VI</sup>), 73.6 (C-2<sup>I</sup>), 70.6 (C-3<sup>II</sup>), 71.7-70.6 (C-5<sup>I-VI</sup>), 62.1-61.3, 58.6-57.7 (OMe), 52.2-51.2 (C-6<sup>I-VI</sup>), 34.8, 34.4 (CH<sub>2</sub>-2), 32.0, 30.0-29.0, 22.8 (CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 25.4-24.8 (CH<sub>2</sub>-3), 14.4 (CH<sub>3</sub>-14).

ESI-MS:  $m/z$  1705.8 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>74</sub>H<sub>126</sub>N<sub>18</sub>O<sub>26</sub>: C 52.78, H 7.54, N 14.97. Found: C 52.95, H 7.62, N 14.64.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltohexaose (14).** To a solution of **10** (131 mg, 96  $\mu$ mol) in acetone (18 mL) was added **77** (160 mg, 1.04 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (0.25  $\mu$ L, 1.44 mmol, 2.5 eq.), and CuI·(EtO)<sub>3</sub>P (3.1 mg, 9  $\mu$ mol, 15 meq.) and the mixture

was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum, the residue was taken in DCM (20 mL) and the solution was then washed with H<sub>2</sub>O (20 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrated, and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting residue purified by column chromatography (50:1 → 15:1 DCM-MeOH). Yield 109 mg (49%). R<sub>f</sub> 0.29 (20:1 DCM-MeOH). [α]<sub>D</sub> = + 124.6 (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K): δ 7.78-7.65 (m, 6 H, *CH*-triazole), 7.29-7.17 (m, 4 H, Ph), 6.86-6.55 (bs, 6 H, *NHBoc*), 5.51 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.1 Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.36-5.27 (m, 4 H, H-1<sup>III-VI</sup>), 5.33 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.1 Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.30, 4.57 (2 d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.18, 4.30 (2 d, 2 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.6 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 4.81-4.00 (m, 12 H, H-6<sup>I-VI</sup>), 4.78-3.90 (m, 4 H, H-5<sup>III-VI</sup>), 4.78-3.93 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 4.09 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.02 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.75 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.60-3.25 (m, 8 H, H-3<sup>III-VI</sup>, H-4<sup>III-VI</sup>), 3.58 (s, 3 H, OMe), 3.56 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.5 Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.53, 3.51 (2 s, 6 H, OMe), 3.50 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.48 (s, 3 H, OMe), 3.41 (2 s, 6 H, OMe), 3.40 (2 s, 6 H, OMe), 3.40 (m, 1 H, H-4<sup>I</sup>), 3.38, 3.35 (s, 6 H, OMe), 3.28 (d, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.19-2.93 (m, 4 H, H-2<sup>III-VI</sup>), 3.06 (d, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 1.39-1.31 (6 s, 54 H, CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 323 K): δ 156.0 (CO), 145.6 (Triazole-C4), 137.6, 137.3, 130.5, 129.9, 128.3, 128.2 (Ph), 125.9-125.1 (Triazole-C5), 99.7-98.8 (C-1<sup>I-VI</sup>), 83.8-80.3 (C-2<sup>II-VI</sup>, C-3<sup>I,III-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 79.7 (C-3<sup>II</sup>), 79.2 (C-2<sup>I</sup>), 78.6 (Cq), 76.4 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 72.2-69.4 (C-5<sup>I-VI</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 61.8-61.4, 58.1-57.4 (OMe), 55.3, 51.0-49.0 (C-6<sup>I-VI</sup>), 36.1 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 28.6 (CMe<sub>3</sub>).

ESI-MS: *m/z* 2318.8 [M + Na]<sup>+</sup>, 1770.7 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>102</sub>H<sub>158</sub>N<sub>24</sub>O<sub>36</sub>: C 53.35, H 6.94, N 14.64. Found: C 53.44, H 7.21, N 14.38.

**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltohexaose (15).**

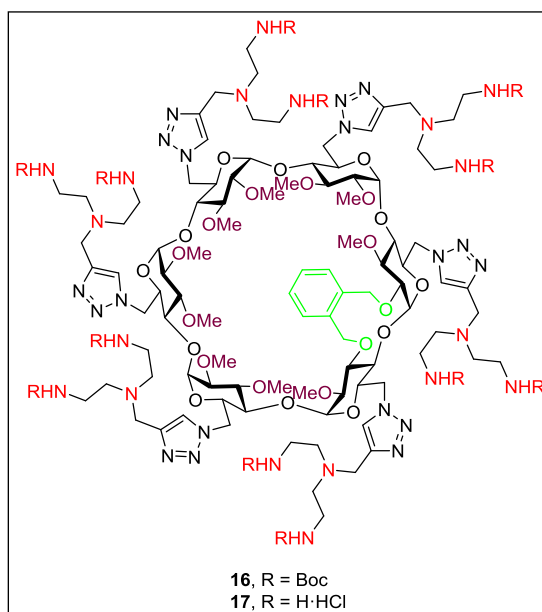
Compound **15** was obtained from **14** (50 mg, 22  $\mu$ mol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 49 mg (quant).  $[\alpha]_D = +52.13$  (*c* 0.75, MeOH).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 323 K):  $\delta$  8.60 (s, 12 H, NH<sub>2</sub>), 8.27-8.22 (6 s, 6 H, CH-triazole), 7.30-7.20 (m, 4 H, Ph), 5.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.35-5.27 (3 d, 3 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>III-VI</sup>), 5.32-5.29, 4.58 (2 d, 2 H,  $^2J_{H,H} = 8.8$  Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.32 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.16, 4.31 (2 d, 2 H,  $^2J_{H,H} = 9.8$  Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 4.82 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.1$  Hz, H-6a<sup>I</sup>), 4.77-4.35 (m, 12 H, H-5<sup>III-VI</sup>, H6a<sup>III-VI</sup>, H-6b<sup>III-VI</sup>), 4.74 (m, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 4.71 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.1$  Hz, H-6a<sup>II</sup>), 4.56-4.49 (m, 2 H, H-5<sup>II</sup>, H-6b<sup>II</sup>), 4.41 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 4.14-3.99 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.75 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.60-3.24 (m, 8 H, H-3<sup>III-VI</sup>, H-4<sup>III-VI</sup>), 3.59 (s, 3 H, OMe), 3.58 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.55, 3.52, 3.50 (3 s, 9 H, OMe), 3.46 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.44 (s, 3 H, OMe), 3.40 (3 s, 9 H, OMe), 3.38 (m, 1 H,  $J_{4,5} = 8.9$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.37, 3.35 (2 s, 6 H, OMe), 3.27 (dd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.06 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.05-2.97 (4 dd, 4 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$  Hz, H-2<sup>III-VI</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  140.6-140.3 (Triazole-C4), 137.6-137.1 (Ph<sub>C-1,2</sub>), 130.8-128.3 (Ph<sub>C-3,6</sub>), 127.1-126.5 (Triazole-C5), 99.5-98.4 (C-1<sup>I-VI</sup>), 83.0-80.5 (C-2<sup>II-VI</sup>, C-3<sup>I,III-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 80.0 (C-3<sup>II</sup>), 78.9 (C-2<sup>I</sup>), 76.3 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 70.7-69.0 (C-5<sup>I-VI</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 61.9-61.5, 58.3-57.5 (OMe), 50.9-50.4 (C-6<sup>II-VI</sup>), 34.5-34.1 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 33.7 (C-6<sup>I</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1718.4 [M + Na]<sup>+</sup>, 879.2 [M + Cu + H]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>72</sub>H<sub>116</sub>N<sub>24</sub>O<sub>24</sub>Cl<sub>6</sub>: C 45.17, H 6.11, N 17.56. Found: C 44.81, H 5.90, N 17.24.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis{4-[*N,N*-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltohexaose (16).** To a solution of **10** (135 mg, 99  $\mu$ mol) in acetone (18 mL) was added **78** (364 mg, 1.07 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (152  $\mu$ L, 0.89 mmol, 1.5 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (2.12 mg, 6  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (20 mL) and washed with water (20 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 199 mg (59%).  $R_f$  0.35 (15:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +32.8$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.88 (m, 6 H,  $\text{CH}$ -triazole), 7.27-7.20 (m, 4 H, Ph), 6.22 (bs, 12 H,  $\text{NH}$ Boc), 5.47 (m, 1 H,  $\text{H}-1^{\text{I}}$ ), 5.36-5.28 (m, 5 H,  $\text{H}-1^{\text{II-VI}}$ ), 5.29, 4.60 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.9$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 5.14, 4.33 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.7$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 4.72-4.19 (m, 42 H,  $\text{H}-6^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{H}-5^{\text{I-VI}}$ , Triazole- $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}-4^{\text{I-VI}}$ ).

<sup>VI</sup>, H-3<sup>I-VI</sup>), 3.59-3.35 (10 s, 30 H, OMe), 3.24 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.20-2.87 (m, 29 H, H-2<sup>II-VI</sup>, CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.54-2.42 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 1.42-1.34 (m, 108 H, CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 323 K): δ 156.0 (CO), 137.5 (Triazole-C4), 131.1-123.1 (Ph), 128.3 (Triazole-C5), 99.9-96.8 (C-1<sup>I-VI</sup>), 82.7-76.3 (C-2<sup>I-VI</sup>, C-3<sup>I-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 78.0 (Cq), 73.2-67.0 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>, C-5<sup>I-VI</sup>), 61.7-57.4 (OMe), 53.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 53.0-48.1 (C-6<sup>I-VI</sup>, Triazole-CH<sub>2</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 28.7 (CMe<sub>3</sub>).

ESI-MS: *m/z* 3435.5 [M + Na]<sup>+</sup>, 1730.3 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>156</sub>H<sub>266</sub>N<sub>36</sub>O<sub>48</sub>: C 54.88, H 7.85, N 14.77. Found: C 54.85, H 7.85, N 14.39.

**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>II-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*o*-xylylene)cyclomaltohexaose (17).** Compound **17** was obtained from **16** (50 mg, 15 μmol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 46 mg (quant). [α]<sub>D</sub> = + 29.3 (*c* 0.75, H<sub>2</sub>O).

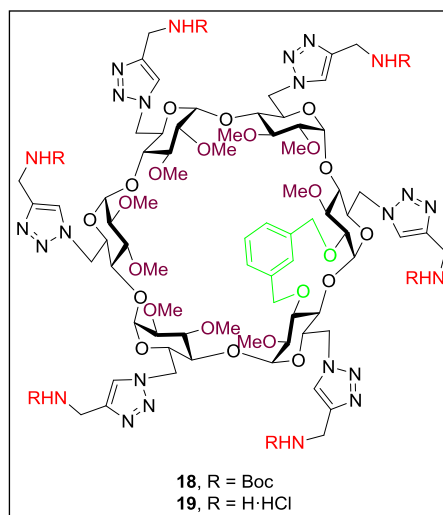
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 343 K): δ 8.71-8.59 (m, 6 H, CH-triazole), 7.89-7.71 (m, 4 H, Ph), 5.84-5.71 (m, 6 H, H-1<sup>I-VI</sup>), 5.58-3.34 (m, 52 H, H-2<sup>I-VI</sup>, H-3<sup>I-VI</sup>, H-4<sup>I-VI</sup>, H-5<sup>I-VI</sup>, H-6<sup>I-VI</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>, Triazole-CH<sub>2</sub>), 4.02, 3.98 (2 s, 6 H, OMe), 3.91 (2 s, 6 H, OMe), 3.83 (4 s, 12 H, OMe), 3.79 (s, 3 H, OMe), 3.77 (s, 3 H, OMe), 3.77-3.66 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.58-3.42 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 140.1-135.2 (Triazole-C4), 131.8-127.7 (Ph, Triazole-C5), 101.0-97.4 (C-1<sup>I-VI</sup>), 83.4-78.9 (C-2<sup>I-VI</sup>, C-3<sup>I-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 71.4-68.2 (C-5<sup>I-VI</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 62.7-56.5 (OMe), 52.0-49.2 (C-6<sup>I-VI</sup>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 47.6-45.4 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 37.5-34.3 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

ESI-MS: *m/z* 1137.9 [M + Cu + H]<sup>2+</sup>.



Anal. Calcd. for  $C_{96}H_{182}N_{36}O_{24}Cl_{12}$ : C 43.51, H 6.92, N 19.03. Found: C 43.21, H 6.67, N 18.68.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-*O*-methyl-2',3''-*O*-(*m*-xylylene)cyclomaltohexaose (18).** To a solution of **11** (69 mg, 51  $\mu$ mol) in acetone (10 mL) was added **77** (85 mg, 0.55 mmol, 1.5 eq.), DIPEA (101  $\mu$ L, 0.61 mmol, 2.0 eq.), and  $CuI \cdot (EtO)_3P$  (5.42 mg, 0.015  $\mu$ mol, 50 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (13 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was dried ( $Na_2SO_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  20:1 DCM-MeOH). Yield 59 mg (50%).  $R_f$  0.45 (15:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +48.8$  (c 1.0,  $CHCl_3$ ).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.95 (bs, 1 H,  $Ph_{H-2}$ ), 7.77-7.59 (6 s, 6 H,  $CH$ -triazole), 7.23 (t, 1 H,  $^2J_{H,H} = 7.2$  Hz,  $Ph_{H-5}$ ), 7.16 (bd, 1 H,  $Ph_{H-4}$ ), 7.02

(bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-6}}$ ), 6.99-6.75 (m, 6 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 5.47-5.24 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 2.4$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{II-VI}}$ ), 5.08, 4.31 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.2$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 4.70, 4.38 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 13.5$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.77-3.97 (m, 24 H,  $\text{H-5}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 4.14 (m, 1 H,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 4.13 (m, 1 H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 3.67-3.36 (10 s, 30 H, OMe), 3.63-2.89 (m, 16 H,  $\text{H-2}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{H-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I,III-VI}}$ ), 1.94 (d, 1 H,  $J_{4,5} = 6.4$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ), 1.43-1.329 (6 s, 54 H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 323 K):  $\delta$  156.0 (CO), 145.7 (Triazole-C4), 140.6, 138.1 ( $\text{Ph}_{\text{C-1,3}}$ ), 132.2-125.0 ( $\text{Ph}_{\text{C-2,4-6}}$ , Triazole-C5), 99.2 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 100.4-97.8 ( $\text{C-1}^{\text{II-VI}}$ ), 82.3-78.6 ( $\text{C-2}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VI}}$ ), 78.5 (Cq), 77.6 ( $\text{C-3}^{\text{II}}$ ), 73.3-69.6 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ,  $\text{C-5}^{\text{I-VI}}$ ), 61.7-57.4 (OMe), 53.1-47.6 ( $\text{C-6}^{\text{I-VI}}$ ), 50.4 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 36.1 ( $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 29.4-28.6 ( $\text{CMe}_3$ ).

ESI-MS:  $m/z$  2319.1  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1170.9  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{102}\text{H}_{158}\text{N}_{24}\text{O}_{36}$ : C 53.35, H 6.94, N 14.64. Found: C 53.13, H 7.06, N 14.41.

**$6^{\text{I-VI}}$ -Hexakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]- $6^{\text{I-VI}}$ -hexadeoxy- $2^{\text{II-VI}}$ ,  $3^{\text{I,III-VI}}$ -deca-*O*-methyl- $2^{\text{I}}$ ,  $3^{\text{II}}$ -*O*-(*m*-xylylene)cyclomaltohexaose (19).**

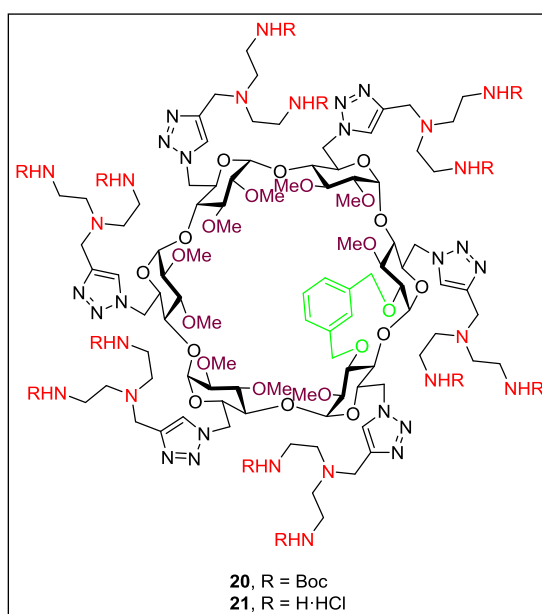
Compound **19** was obtained from **18** (46 mg, 20  $\mu\text{mol}$ ) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 39 mg (quant).  $[\alpha]_{\text{D}} = +36.13$  ( $c$  0.75, MeOH).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 323 K):  $\delta$  8.43-8.26 (s, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 8.05 (bs, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.61 (t, 1 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz,  $\text{Ph}_{\text{H-5}}$ ), 7.57 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4}}$ ), 7.29 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-6}}$ ), 5.56-5.50 (4 d, 4 H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{III-VI}}$ ), 5.42, 4.55 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.2$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 5.35 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.7$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{II}}$ ), 5.10-3.55 (m, 31 H,  $\text{H-5}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 4.89, 4.77 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.55 (m, 1 H,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 4.30-3.40 (m, 15 H,  $\text{H-2}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I,III-VI}}$ ), 4.15 (m, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 3.82-3.65 (10 s, 30 H, OMe), 1.76 (m, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 140.1-136.3 (Triazole-C4,  $\text{Ph}_{\text{C-1,3}}$ ), 130.0-127.2 ( $\text{Ph}_{\text{C-2,4-6}}$ , Triazole-C5), 99.6-97.0 ( $\text{C-1}^{\text{I-VI}}$ ), 81.9-78.5 ( $\text{C-2}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VI}}$ ), 72.9 ( $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 71.2-68.6 ( $\text{C-5}^{\text{I-VI}}$ ), 60.4-57.2 (OMe), 51.6-49.6 ( $\text{C-6}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ), 33.8 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1717.4  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 880.2  $[\text{M} + \text{Cu} + \text{H}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{72}\text{H}_{116}\text{N}_{24}\text{O}_{24}\text{Cl}_6$ : C 45.17, H 6.11, N 17.56. Found: C 44.93, H 5.88, N 17.31.



**$6^{\text{I-VI}}$ -Hexakis{4-[*N,N*-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}- $6^{\text{I-VI}}$ -hexadeoxy- $2^{\text{II-VI}}$ , $3^{\text{I,III-VI}}$ -deca-*O*-methyl- $2^{\text{I}}$ , $3^{\text{II}}$ -*O*-(*m*-xylylene)cyclomaltohexaose (20).** To a solution of **11** (74 mg, 54  $\mu\text{mol}$ ) in acetone (9 mL) was added **78** (199 mg, 0.58 mmol, 2.5 eq.), DIPEA (83  $\mu\text{L}$ , 0.49 mmol, 1.5 eq.) and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (1.2 mg, 3  $\mu\text{mol}$ , 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM

(12 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  20:1 DCM-MeOH). Yield 98 mg (53%).  $R_f$  0.43 (15:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +9.4$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.95 (bs, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.85, 7.73, 7.71, 7.69 (s, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 7.25 (t, 1 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz,  $\text{Ph}_{\text{H-5}}$ ), 7.19 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4}}$ ), 6.92 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-6}}$ ), 6.32-6.06 (m, 12 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 5.49, 5.30, 5.23 (4 d, 4 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{III-VI}}$ ), 5.40 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.9$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{II}}$ ), 5.07, 4.33 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.7$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 4.84, 4.65 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.2$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.74-4.06 (m, 18 H,  $\text{H-5}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VI}}$ ), 4.57 (m, 1 H,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 4.25 (m, 1 H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 3.80-3.39 (m, 12 H,  $\text{Triazole-CH}_2$ ), 3.68-3.35 (10 s, 30 H,  $\text{OMe}$ ), 3.64-2.88 (m, 15 H,  $\text{H-2}^{\text{I-V}}$ ,  $\text{H-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I,III-VI}}$ ), 2.85 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.9$  Hz,  $\text{H-2}^{\text{VI}}$ ), 3.16-2.87 (m, 12 H,  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 2.58-2.33 (m, 12 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 2.01 (m, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ), 1.41-1.36 (6 s, 108 H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 323 K):  $\delta$  156.0 (CO), 143.4 ( $\text{Triazole-C}_4$ ), 140.4, 138.1 ( $\text{Ph}_{\text{C-1,3}}$ ), 129.4 ( $\text{Ph}_{\text{C-5}}$ ), 128.9 ( $\text{Ph}_{\text{C-2}}$ ), 127.8 ( $\text{Ph}_{\text{C-6}}$ ), 127.0-125.6 ( $\text{Ph}_{\text{C-4}}$ ,  $\text{Triazole-C}_5$ ), 98.8 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 98.0-96.4 ( $\text{C-1}^{\text{II-VI}}$ ), 83.1-75.9 ( $\text{C-2}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VI}}$ ), 78.0 (Cq), 73.8 ( $\text{C-3}^{\text{II}}$ ), 72.1 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 70.8-66.4 ( $\text{C-5}^{\text{I-VI}}$ ), 61.3-57.7 ( $\text{OMe}$ ), 53.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 50.8 ( $\text{C-6}^{\text{I-VI}}$ ), 50.0 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 48.3-47.9 ( $\text{Triazole-CH}_2$ ), 38.7 ( $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 28.7 ( $\text{CMe}_3$ ).

ESI-MS:  $m/z$  3436.6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1729.6  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{156}\text{H}_{266}\text{N}_{36}\text{O}_{48}$ : C 54.88, H 7.85, N 14.77. Found: C 54.76, H 8.04, N 14.48.

**$6^{\text{I-VI}}$ -Hexakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}- $6^{\text{I-VI}}$ -hexadeoxy- $2^{\text{II-VI}}$ ,  $3^{\text{I,III-VI}}$ -deca-*O*-methyl- $2^{\text{I}}$ ,  $3^{\text{II}}$ -*O*-(*m*-xylylene)cyclomaltohexaose (21).** Compound **21** was obtained from **20** (64 mg,

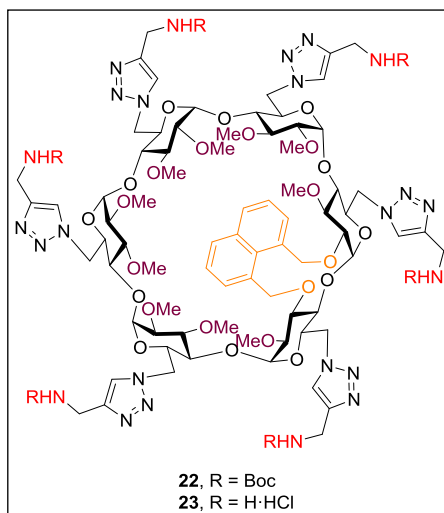
19  $\mu\text{mol}$ ) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 53 mg (quant).  $[\alpha]_{\text{D}} = +14.0$  ( $c$  0.75,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 323 K):  $\delta$  8.44-8.25 (6 s, 6 H, CH-triazole), 8.07 (s, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.57, (t, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz,  $\text{Ph}_{\text{H-5}}$ ), 7.55 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4}}$ ), 7.14 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-6}}$ ), 5.65-5.54 (4 d, 4 H,  $J_{1,2} = 3.0$  Hz  $\text{H-1}^{\text{III-VI}}$ ), 5.47 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 5.0$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{II}}$ ), 5.44, 4.57 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.7$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 5.14-4.17 (m, 17 H,  $\text{H-5}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ), 4.72 (m, 2 H,  $\text{H-6}^{\text{II}}$ ), 4.58 (m, 1 H,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 4.42-4.18 (m, 12 H, Triazole- $\text{CH}_2$ ), 4.38 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{II}}$ ), 4.24 (m, 1 H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 4.23 (m, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 4.07-3.06 (m, 15 H,  $\text{H-2}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I,III-VI}}$ ), 3.90-3.66 (10 s, 30 H, OMe), 3.68-3.39 (m, 24 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.33-3.06 (m, 24 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.69 (d, 1 H,  $J_{4,5} = 8.1$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  140.0, 136.3 ( $\text{Ph}_{\text{C-1,3}}$ ), 139.6 (Triazole- $\text{C4}$ ), 129.9 ( $\text{Ph}_{\text{C-2}}$ ), 128.5-127.1 ( $\text{Ph}_{\text{C-4,6}}$ , Triazole- $\text{C5}$ ), 99.5 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 98.4-97.1 ( $\text{C-1}^{\text{II-VI}}$ ), 82.0-74.2 ( $\text{C-2}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VI}}$ ), 75.5 ( $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ), 72.9 ( $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 70.5-69.0 ( $\text{C-5}^{\text{I-VI}}$ ), 60.5-57.3 (OMe), 51.3 ( $\text{C-6}^{\text{II}}$ ), 49.8-49.5 ( $\text{C-6}^{\text{I,III-VI}}$ ), 49.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 46.0-44.5 (Triazole- $\text{CH}_2$ ), 35.8 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  2212.9  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 1106.9  $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{96}\text{H}_{182}\text{N}_{36}\text{O}_{24}\text{Cl}_{12}$ : C 43.51, H 6.92, N 19.03. Found: C 43.14, H 6.88, N 18.71.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(1,8-dimethylnaphthylene)cyclomaltohexaose (22).** To a solution of **12** (129 mg, 91  $\mu$ mol) in acetone (16 mL) was added **77** (153 mg, 0.98 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (181  $\mu$ L, 1.09 mmol, 2.0 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (5.87 mg, 16  $\mu$ mol, 30 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (15 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 86 mg (40%).  $R_f$  0.29 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = -30.2$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.96 (bd, 2 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, Naphth<sub>H-4,5</sub>), 7.71-7.67 (6s, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 7.59 (m, 2 H, Naphth<sub>H-2,7</sub>), 7.51 (m, 2 H, Naphth<sub>H-3,6</sub>), 6.93 (bs, 6 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 6.19, 4.56 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.1$  Hz, Naphth $\text{CH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 5.58, 4.51 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.1$  Hz, Naphth $\text{CH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 5.54 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 5.39-5.32 (m, 5 H,  $\text{H-1}^{\text{II-VI}}$ ), 4.82-4.09 (m, 16 H,  $\text{H-5}^{\text{III-VI}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VI}}$ ).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 4.38 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.29 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 4.17-4.11 (6 s, 12 H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 3.98 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.2 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.66 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 8.8 Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.67-3.27 (m, 8 H, H-3<sup>III-VI</sup>, H-4<sup>III-VI</sup>), 3.64-3.35 (10 s, 30 H, OMe), 3.61 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.36 (m, 1 H, H-4<sup>I</sup>), 3.56 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.05-2.95 (m, 4 H, H-2<sup>III-VI</sup>), 3.03 (dd, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.6 Hz, H-2<sup>II</sup>), 1.36-1.32 (6 s, 54 H, CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (150.9 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 156.0 (CO), 145.6 (Triazole-C4), 135.4-128.7 (Naphth<sub>C-1,8-10</sub>), 133.5, 133.3 (Naphth<sub>C-2,7</sub>), 130.9 (Naphth<sub>C-4,5</sub>), 125.8, 125.7 (Naphth<sub>C-3,6</sub>), 125.2-124.8 (Triazole-C5), 99.6-97.7 (C-1<sup>I-VI</sup>), 81.9-78.6 (C-2<sup>I-VI</sup>, C-3<sup>I-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 78.3 (Cq), 77.1 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 69.9 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 70.1-69.2 (C-5<sup>I-VI</sup>), 62.0-61.3, 58.0-57.7 (OMe), 50.6-49.9 (C-6<sup>I-VI</sup>), 36.0 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 28.6 (CMe<sub>3</sub>).

ESI-MS: *m/z* 2369.2 [M + Na]<sup>+</sup>, 1196.0 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>106</sub>H<sub>160</sub>N<sub>24</sub>O<sub>36</sub>: C 54.26, H 6.87, N 14.33. Found: C 54.42, H 7.12, N 14.01.

**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II</sup>, 3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methyl-2<sup>I</sup>, 3<sup>II</sup>-O-[1,8-dimethylnaphthylene)cyclomaltohexaose (23).** Compound **23** was obtained from **22** (49 mg, 21 μmol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 54 mg (quant). [α]<sub>D</sub> = + 75.2 (c 0.75, MeOH).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 323 K): δ 8.58-8.28 (bs, 12 H, NH<sub>2</sub>), 8.19-8.14 (6 s, 6 H, CH-triazole), 7.96 (bd, 2 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, Naphth<sub>H-4,5</sub>), 7.60 (dd, 1 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 1.1 Hz, Naphth<sub>H-7</sub>), 7.57 (dd, 1 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 1.1 Hz, Naphth<sub>H-2</sub>), 7.50 (m, 2 H, Naphth<sub>H-3,6</sub>), 6.20 (d, 1 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, NaphthCH<sub>2a</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.61 (d, 1 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, NaphthCH<sub>2a</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.56 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 2.6 Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.30-5.25 (m, 5 H, H-1<sup>II-VI</sup>), 4.86-3.86 (m, 14 H, NaphthCH<sub>2b</sub>-O2<sup>I</sup>, NaphthCH<sub>2b</sub>-O3<sup>II</sup>, H-5<sup>I-VI</sup>, H-6<sup>I-VI</sup>), 4.11-3.87 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.09-3.27 (m, 13 H, H-2<sup>I</sup>, H-3<sup>I-VI</sup>, H-4<sup>I-VI</sup>), 3.61-3.32 (10 s, 30 H, OMe), 3.06-2.97 (m, 5 H, H-2<sup>II-VI</sup>).

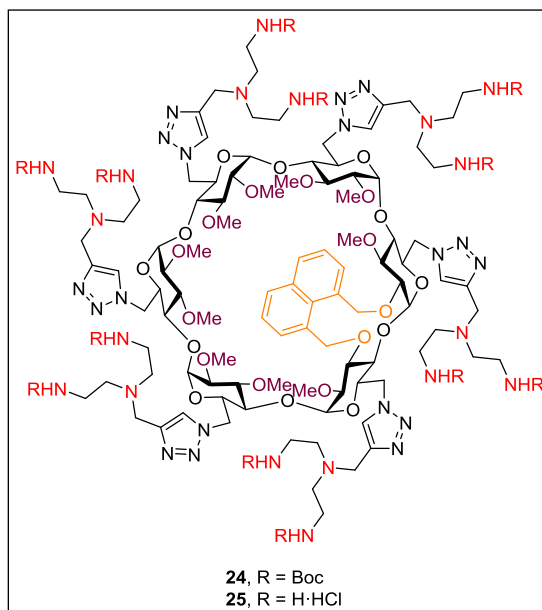
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.58-8.28 (bs, 12 H,  $\text{NH}_2$ ), 8.15-7.93 (m, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 7.72-7.48 (m, 4 H, Naphth), 6.20 (d, 1 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz, Naphth $\text{CH}_{2a}\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 5.73-4.22 (m, 9 H, Naphth $\text{CH}_{2b}\text{-O}3^{\text{II}}$ , Naphth $\text{CH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ , H-1 $^{\text{I-VI}}$ ), 4.85-2.83 (m, 36 H, H-2 $^{\text{I-VI}}$ , H-3 $^{\text{I-VI}}$ , H-4 $^{\text{I-VI}}$ , H-5 $^{\text{I-VI}}$ , H-6 $^{\text{I-VI}}$ ), 4.33-3.95 (m, 24 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.60, 3.53, 3.50, 3.46, 3.45 (5 s, 15 H, OMe), 3.37-3.33 (m, 15 H, OMe).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , 323 K):  $\delta$  140.1 (Triazole-C4), 125.4, 134.0-133.1, 131.0, 125.8, 125.7 (Naphth), 126.9 (Triazole-C5), 100.0, 99.7, 99.2-99.0 (C-1 $^{\text{I-VI}}$ ), 84.4-79.4 (C-2 $^{\text{I-VI}}$ , C-3 $^{\text{I-VI}}$ , C-4 $^{\text{I-VI}}$ ), 77.2 (Naphth $\text{CH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 70.8-69.7 (C-5 $^{\text{I-VI}}$ , Naphth $\text{CH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 61.5-61.3, 59.0, 58.2-57.8 (OMe), 50.9-50.4 (C-6 $^{\text{I-VI}}$ ), 34.18 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1844.3  $[\text{M} + \text{CuCl} + \text{H}]^+$ , 904.2  $[\text{M} + \text{Cu} + \text{H}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{76}\text{H}_{118}\text{N}_{24}\text{O}_{24}$ : C 46.46, H 6.05, N 17.11. Found: C 46.20, H 5.74, N 16.76.





**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis{4-[*N,N*-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-(1,8-**

**dimethylnaphthylene)cyclomaltohexaose (24).** To a solution of **12** (107 mg, 76  $\mu$ mol) in acetone (14 mL) was added **78** (279 mg, 0.82 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (116  $\mu$ L, 0.68 mmol, 1.5 eq.), and CuI·(EtO)<sub>3</sub>P (1.62 mg, 5  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (15 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 114 mg (44%). *R<sub>f</sub>* 0.39 (15:1 DCM-MeOH). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 27.8 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K):  $\delta$  7.96 (bd, 2 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, Naphth<sub>H-4,5</sub>), 7.80, (m, 6 H, *CH*-triazole), 7.62, 7.58 (2 bd, 2 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, Naphth<sub>H-2,7</sub>), 7.50 (m, 2 H, Naphth<sub>H-3,6</sub>), 6.21 (m, 7 H, *NH*Boc, NaphthCH<sub>2a</sub>-O<sup>3II</sup>),

5.60, 4.49 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.8$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.54 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.38-5.32 (m, 4 H, H-1<sup>III-VI</sup>), 5.33 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.80 (m, 2 H, H-6<sup>II</sup>), 4.73-4.51 (m, 9 H, H-6<sup>III-VI</sup>, NaphthCH<sub>2b</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.52 (m, 2 H, 6<sup>I</sup>), 4.38 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.30-4.17 (m, 4 H, H-5<sup>III-VI</sup>), 4.28 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.97 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.80-3.23 (m, 38 H, H-3<sup>III-VI</sup>, H-4<sup>III-VI</sup>, OMe), 3.73 (m, 12 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.66 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.8$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.62 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.54 (m, 1 H, H-4<sup>I</sup>), 3.34 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.04-2.95 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>NHBoc, H-2<sup>III-VI</sup>), 3.01 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 2.50-2.43 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 1.41-1.32 (m, 108 H, CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 323 K):  $\delta$  156.0 (CO), 143.6 (Triazole-C4), 135.5-124.1 (Naphth), 126.2 (Triazole-C5), 99.9 (C-1<sup>I</sup>), 99.4 (C-1<sup>II</sup>), 98.8-98.6 (C-1<sup>III-VI</sup>), 84.2-79.5 (C-2<sup>I-VI</sup>, C-3<sup>I,III-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 80.3 (C-3<sup>II</sup>), 78.0 (Cq), 77.2 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 70.8 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 70.1 (C-5<sup>I-VI</sup>), 61.4, 58.2-57.78 (OMe), 53.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 50.4 (C-6<sup>I-VI</sup>), 48.3 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 28.7 (CMe<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  3486.5 [M + Na]<sup>+</sup>, 1754.1 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>160</sub>H<sub>268</sub>N<sub>36</sub>O<sub>48</sub>: C 55.48, H 7.80, N 14.56. Found: C 55.37, H 8.14, N 14.22.

**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(1,8-dimethylnaphthylene)cyclomaltohexaose (25).** Compound **25** was obtained from **24** (64 mg, 18  $\mu$ mol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 63 mg (quant). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 33.7 (*c* 0.75, DMSO).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, 2:1 MeOD:D<sub>2</sub>O, 323 K):  $\delta$  7.95 (m, 6 H, CH-triazole), (bd, 2 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$  Hz, Naphth<sub>H-4,5</sub>), 7.65 (2 dd, 2 H, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$  Hz, Naphth<sub>H-2,7</sub>), 7.51, 7.50 (2 t, 2 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$  Hz, Naphth<sub>H-3,6</sub>), 6.29, 4.71 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.0$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.64, 4.64 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.6$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.60 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.45-5.42 (m, 5 H, H-1<sup>II-VI</sup>),

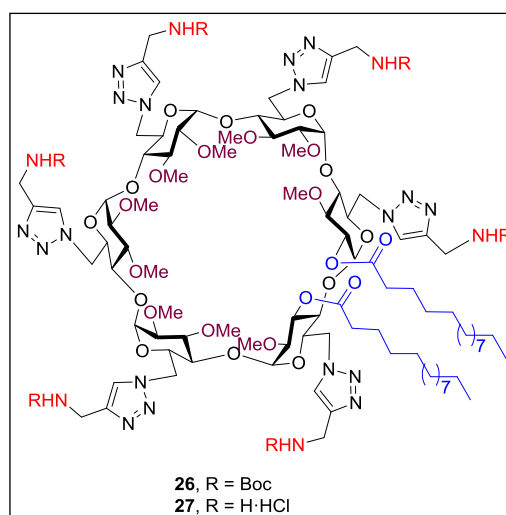
5.00-4.50 (m, 10 H, H-6<sup>II-VI</sup>), 4.89, 4.55 (m, 2 H, H-6<sup>I</sup>), 4.62-4.02 (m, 5 H, H-5<sup>II-VI</sup>), 4.46 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 4.09 (m, 12 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.80-3.22 (m, 10 H, H-3<sup>II-VI</sup>, H-4<sup>II-VI</sup>), 3.77 (m, 1 H, H-3<sup>I</sup>), 3.76-3.46 (10 s, 30 H, OMe), 3.67 (m, 1 H, H-4<sup>I</sup>), 3.44 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.17-3.05 (m, 5 H, H-2<sup>II-VI</sup>), 3.32-3.22 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.06-2.98 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 141.3 (Triazole-C4), 125.2-125.3 (Naphth), 127.6 (Triazole-C5), 99.8-99.3 (C-1<sup>I-VI</sup>), 81.8-79.5 (C-2<sup>I-VI</sup>, C-3<sup>I-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 69.9 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>, C-5<sup>I-VI</sup>), 61.3, 57.6 (OMe), 50.4 (C-6<sup>I-VI</sup>), 49.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 44.9 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 36.6 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

ESI-MS: *m/z* 2262.8 [M + H]<sup>+</sup>, 1131.9 [M + 2 H]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>100</sub>H<sub>184</sub>N<sub>36</sub>O<sub>24</sub>Cl<sub>12</sub>: C 44.48, H 6.87, N 18.67, O 14.22.

Found: C 44.20, H 6.63, N 18.30.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-myristoylcyclomaltohexaose**

**(26).** To a solution of **13** (118 mg, 70  $\mu$ mol) in acetone (13 mL) was added **77** (106 mg, 0.68 mmol, 1.6 eq.), DIPEA (81  $\mu$ L, 0.47 mmol, 1.1 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (2 mg, 6  $\mu$ mol, 15 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum and purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  20:1 DCM-MeOH). Yield 83 mg (45%).  $R_f$  0.28 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = -38.2$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.77-7.65 (m, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 6.86-6.65 (m, 6 H,  $\text{NH-Boc}$ ), 5.35-5.24 (m, 6 H,  $\text{H-1}^{\text{I-VI}}$ ), 5.37 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.7$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 4.85-4.25 (m, 12 H,  $\text{H-6}^{\text{I-VI}}$ ), 4.57 (bd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.3$  Hz,  $\text{H-2}^{\text{I}}$ ), 4.24-3.91 (m, 18 H,  $\text{H-5}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{CH}_2\text{NH-Boc}$ ), 3.63-3.24 (m, 11 H,  $\text{H-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I-VI}}$ ), 3.54-3.32 (10 s, 30 H, OMe), 3.12-2.93 (m, 5 H,  $\text{H-2}^{\text{II-VI}}$ ), 2.39-2.31 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-2}$ ), 1.63-1.50 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-3}$ ), 1.41-1.18 (m, 83 H,  $\text{CH}_2\text{-4} - \text{CH}_2\text{-13}$ ,  $\text{CMe}_3$ ), 0.90-0.83 (m, 6 H,  $\text{CH}_3\text{-14}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  172.8, 172.3 (CO ester), 155.9 (CO carbamate), 146.4 (Triazole-C4), 125.4 (Triazole-C5), 99.5-96.4 ( $\text{C-1}^{\text{I-VI}}$ ), 82.2-77.7 ( $\text{C-2}^{\text{II-VI}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VI}}$ ), 78.4 (Cq), 73.0 ( $\text{C-2}^{\text{I}}$ ), 71.5 ( $\text{C-3}^{\text{II}}$ ), 70.5-69.4 ( $\text{C-5}^{\text{I-VI}}$ ), 61.6-57.6 (OMe), 51.0-49.7 ( $\text{C-6}^{\text{I-VI}}$ ), 36.4 ( $\text{CH}_2\text{NH-Boc}$ ), 34.3-34.0 ( $\text{CH}_2\text{-2}$ ), 29.4-28.7 ( $\text{CMe}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{-4} - \text{CH}_2\text{-13}$ ), 24.9 ( $\text{CH}_2\text{-3}$ ), 14.2 ( $\text{CH}_3\text{-14}$ ).

ESI-MS:  $m/z$  2637.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1330.0  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{122}\text{H}_{204}\text{N}_{24}\text{O}_{38}$ : C 56.03, H 7.86, N 12.85. Found: C 56.31, H 7.94, N 12.89.

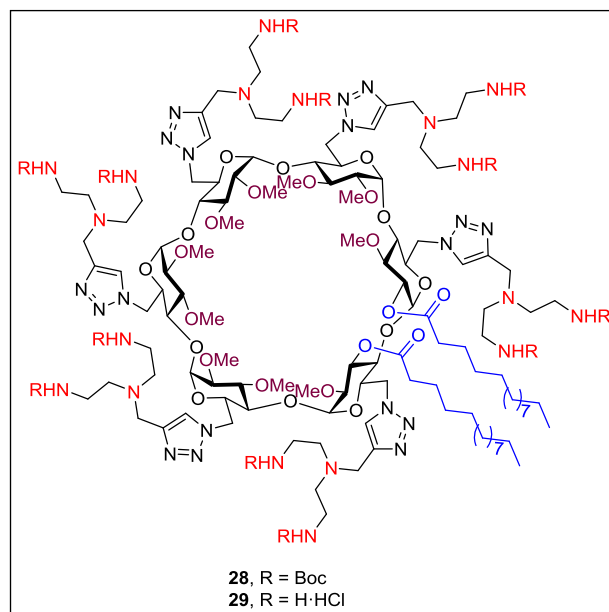
**$6^{\text{I-VI}}$ -Hexakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]- $6^{\text{I-VI}}$ -hexadeoxy- $2^{\text{II-VI}}$ ,  $3^{\text{I,III-VI}}$ -deca-*O*-methyl- $2^{\text{I}}$ ,  $3^{\text{II}}$ -*O*-myristoylcyclomaltohexaose (**27**).** Compound **27** was obtained from **26** (83 mg, 32  $\mu$ mol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 74 mg (quant).  $[\alpha]_D = +53.75$  ( $c$  0.48, MeOH).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, 10:1 DMSO- $d_6$ -D $_2$ O, 323 K):  $\delta$  8.63 (bs, 12 H,  $\text{NH}_2$ ), 8.32-8.13 (6 s, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 5.40 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 5.37-5.25, 5.14 (m, 6 H,  $J_{1,2} = 3.4$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I-VI}}$ ), 4.86-3.67 (m, 15 H,  $\text{H-5}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-6a}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{H-6b}^{\text{I,III-VI}}$ ), 4.48 (bd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.5$  Hz,  $\text{H-2}^{\text{I}}$ ), 4.35 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{II}}$ ), 4.27-3.82 (m, 24 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.90 (m, 2 H,  $\text{H-6a}^{\text{II}}$ ,  $\text{H-6b}^{\text{II}}$ ), 3.75-3.11 (m, 10 H,  $\text{H-3}^{\text{III-VI}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{III-VI}}$ ), 3.56, 3.49 (2 t, 2 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{I}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I}}$ ), 3.56, 3.54, 3.52, 3.47, 3.44, 3.42, 3.40 (7 s, 21 H, OMe), 3.39 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.2$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ), 3.39, 3.37, 3.32 (3 s, 9 H, OMe), 3.16-2.95 (m, 4 H,  $\text{H-2}^{\text{III-VI}}$ ), 3.13 (bd, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 2.41-2.25 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ -2), 1.64-1.49 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ -3), 1.38-1.14 (m, 40 H,  $\text{CH}_2$ -4 -  $\text{CH}_2$ -13), 0.91-0.79 (m, 6 H,  $\text{CH}_3$ -14).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz, 10:1 DMSO- $d_6$ -D $_2$ O):  $\delta$  173.1-172.6 (CO), 140.7 (Triazole-C4), 127.3 (Triazole-C5), 100.0-96.5 ( $\text{C-1}^{\text{I-VI}}$ ), 83.0-78.2 ( $\text{C-2}^{\text{II-VI}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I,III-VI}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VI}}$ ), 73.1 ( $\text{C-2}^{\text{I}}$ ), 71.0-73.9 ( $\text{C-3}^{\text{II}}$ ,  $\text{C-5}^{\text{I-VI}}$ ), 62.1-57.5 (OMe), 51.4-50.0 ( $\text{C-6}^{\text{I,III-VI}}$ ), 34.8-33.6 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ -2), 32.5-22.4 ( $\text{CH}_2$ -4 -  $\text{CH}_2$ -13), 25.2-23.7 ( $\text{CH}_2$ -3), 14.4 ( $\text{CH}_3$ -14).

ESI-MS:  $m/z$  2113.9 [ $\text{M} + \text{CuCl} + \text{H}$ ] $^+$ , 2015.0 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , 1039.3 [ $\text{M} + \text{Cu} + \text{H}$ ] $^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{92}\text{H}_{162}\text{N}_{24}\text{O}_{26}\text{Cl}_6$ : C 49.48, H 7.31, N 15.05. Found: C 49.56, H 7.13, N 14.79.



**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis{4-[N,N-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-myristoylcyclomaltohexaose**

(28). To a solution of **13** (88 mg, 52  $\mu$ mol) in acetone (10 mL) was added **78** (193 mg, 0.56 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (81  $\mu$ L, 0.47 mmol, 1.5 eq.), and CuI·(EtO)<sub>3</sub>P (1 mg, 3  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum, the residue was taken in DCM (15 mL) and the solution was then washed with H<sub>2</sub>O (15 mL). The organic layer was dried (MgSO<sub>4</sub>), filtrated and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting residue purified by column chromatography (50:1 → 15:1 DCM-MeOH). Yield 127 mg (65%). *R<sub>f</sub>* 0.35 (20:1 DCM-MeOH). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 19.5 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K):  $\delta$  7.84-7.78 (m, 6 H, CH-triazole), 6.31-6.08 (bs, 6 H, NHBoc), 5.39 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.6 Hz, H-3<sup>II</sup>), 5.37-5.30 (6 s, 6 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.23 Hz, H-1<sup>I-VI</sup>), 4.50 (dd, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 2.9 Hz, *J*<sub>2,3</sub> = 10.2 Hz, H-2<sup>I</sup>), 4.77-4.17 (m, 18 H, H-5<sup>I-VI</sup>, H-6<sup>I-VI</sup>), 3.77-3.68 (m, 12 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.67-3.17 (m, 41

H, H-3<sup>I,III-VI</sup>, H-4<sup>I-VI</sup>, OMe), 3.05-2.9 (m, 5 H, H-2<sup>II-VI</sup>), 3.03-2.97 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.51-2.41 (m, 26 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.38-2.28 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-2), 1.60-1.55 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-3), 1.41-1.22 (m, 148 H, CMe<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 0.88-0.86 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>-14).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 172.4, 172.8 (CO ester), 156.0 (CO carbamate), 143.3 (Triazole-C4), 126.3 (Triazole-C5), 99.1-96.4 (C-1<sup>I-VI</sup>), 82.1-78.1 (C-2<sup>II-VI</sup>, C-3<sup>I,III-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 77.9 (Cq), 72.9 (C-2<sup>I</sup>), 71.1 (C-3<sup>II</sup>), 71.1-69.5 (C-5<sup>I-VI</sup>), 61.6-61.1, 58.6-57.6 (OMe), 53.5-52.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 50.7-49.4 (C-6<sup>I-VI</sup>), 48.2-47.7 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 38.6 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 34.2-33.6 (CH<sub>2</sub>-2), 31.8-22.6 (CH<sub>2</sub>-3 - CH<sub>2</sub>-13, CMe<sub>3</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>-14).

ESI-MS: *m/z* 3755.7 [M + Na]<sup>+</sup>, 1888.1 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>176</sub>H<sub>312</sub>N<sub>36</sub>O<sub>50</sub>: C 56.63, H 8.43, N 13.51. Found: C 56.50, H 8.64, N 13.15.

**6<sup>I-VI</sup>-Hexakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VI</sup>-hexadeoxy-2<sup>II-VI</sup>,3<sup>I,III-VI</sup>-deca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-**

**myristoylcyclomaltohexaose (29).** Compound **29** was obtained from **28** (48 mg, 13 μmol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 46 mg (quant). [α]<sub>D</sub> = + 22.27 (c 0.75, MeOH).

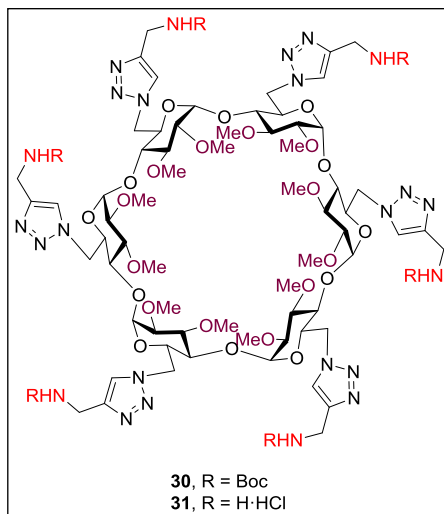
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K): δ 8.26-8.20 (6 s, 6 H, CH-triazole), 5.38 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.6 Hz, H-3<sup>II</sup>), 5.32 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.1 Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.31-5.24 (m, 4 H, H-1<sup>III-VI</sup>), 5.28 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 2.7 Hz, H-1<sup>I</sup>), 4.75-3.99 (m, 26 H, Triazole-CH<sub>2</sub>, H-6<sup>II-VI</sup>, H-5<sup>III-VI</sup>), 4.66 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 13.2 Hz, H-6a<sup>I</sup>), 4.58 (bd, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 4.23 (m, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = 9.6 Hz, H-5<sup>II</sup>), 4.38 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.9 Hz, H-2<sup>I</sup>), 4.37 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.60-3.16 (m, 8 H, H-3<sup>III-VI</sup>, H-4<sup>III-VI</sup>), 3.55 (t, 1 H, *J*<sub>3,4</sub> = 9.9 Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.53 (s, 6 H, OMe), 3.49, 3.45, 3.41 (3 s, 9 H, OMe), 3.48 (t, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = 9.9 Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.48 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.38 (s, 6 H, OMe), 3.37, 3.35, 3.31 (3 s, 9 H, OMe), 3.21-3.10 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.17-2.90 (m, 4 H, H-2<sup>III-VI</sup>), 3.10-2.97 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>),

3.08 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 2.39-2.24 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-2), 1.61-1.50 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-3), 1.33-1.16 (m, 40 H, CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 0.87-0.81 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>-14).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.3-172.3 (CO), 138.4 (Triazole-C4), 129.0 (Triazole-C5), 100.0-98.0 (C-1<sup>I-VI</sup>), 82.9-78.2 (C-2<sup>II-VI</sup>, C-3<sup>I,III-VI</sup>, C-4<sup>I-VI</sup>), 70.9 (C-3<sup>II</sup>), 70.3-69.1 (C-2<sup>I</sup>, C-5<sup>I-VI</sup>), 61.8-57.4 (OMe), 50.9-49.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 47.5-46.0 (C-6<sup>I-VI</sup>), 40.2-38.5 Triazole-CH<sub>2</sub>, 35.2 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 34.3-33.7 (CH<sub>2</sub>-2), 32.2-28.3, 23.4-22.3 (CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 25.2-23.6 (CH<sub>2</sub>-3), 14.6-14.1 (CH<sub>3</sub>-14).

ESI-MS: *m/z* 2531.3 [M + H]<sup>+</sup>, 1266.1 [M + 2 H]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>116</sub>H<sub>228</sub>N<sub>36</sub>O<sub>26</sub>Cl<sub>6</sub>: C 46.93, H 7.74, N 16.99. Found: C 46.69, H 7.52, N 16.72.



**Hexakis{6-[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl}cyclomaltohexaose (30).** To a solution of **74** (0.25 g, 0.19 mmol) in acetone (25 mL) was added **77** (0.32 g, 2.09 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (0.40 mL, 2.32 mmol, 2.0 eq.), and CuI·(EtO)<sub>3</sub>P (21 mg, 58 μmol, 50 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was



removed under vacuum, the residue was taken in DCM (35 mL) and the solution was then washed with H<sub>2</sub>O (35 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrated and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting residue purified by column chromatography (50:1 → 20:1 DCM-MeOH). Yield 252 mg (58%). *R*<sub>f</sub> 0.20 (20:1 DCM-MeOH). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 64.5 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K):  $\delta$  7.69 (s, 6 H, *CH*-triazole), 6.81 (bs, 6 H, *NH*Boc), 5.31 (d, 6 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.3 Hz, H-1<sup>I-VI</sup>), 4.62, 4.45 (2 bd, 12 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 12.7 Hz, H-6a<sup>I-VI</sup>, H-6b<sup>I-VI</sup>), 4.19-4.03 (m, 12 H, *CH*<sub>2</sub>*NH*Boc), 4.09-4.03 (m, 6 H, H-5<sup>I-VI</sup>), 3.53, 3.39 (2 s, 36 H, OMe), 3.49 (t, 6 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.3 Hz, H-3<sup>I-VI</sup>), 3.32 (t, 6 H, H-4<sup>I-VI</sup>), 2.98 (dd, 6 H, H-2<sup>I-VI</sup>), 1.35 (s, 54 H, *CMe*<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K):  $\delta$  155.9 (CO), 145.6 (Triazole-C4), 125.2 (Triazole-C5), 99.1 (C-1<sup>I-VI</sup>), 82.4 (C-4<sup>I-VI</sup>), 81.7 (C-2<sup>I-VI</sup>), 81.1 (C-3<sup>I-VI</sup>), 78.6 (Cq), 70.6 (C-5<sup>I-VI</sup>), 61.3, 58.1 (OMe), 50.4 (C-6<sup>I-VI</sup>), 36.3 (*CH*<sub>2</sub>*NH*Boc), 28.7 (*CMe*<sub>3</sub>).

ESI-MS: *m/z* 2244.7 [*M* + Na]<sup>+</sup>, 1133.8 [*M* + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>96</sub>H<sub>156</sub>N<sub>24</sub>O<sub>36</sub>: C 51.88, H 7.08, N 15.13. Found: C 52.11, H 7.27, N 14.85.

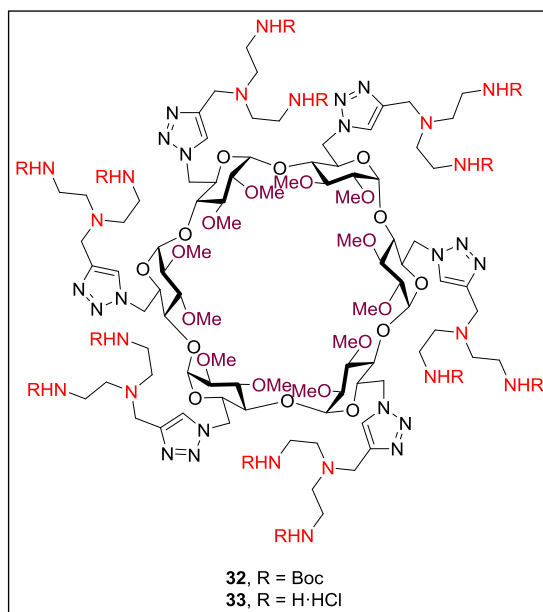
**Hexakis{6-[4-(aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6-deoxy-2,3-di-O-methyl}cyclomaltohexaose (31).** Compound **31** was obtained from **30** (210 mg, 94  $\mu$ mol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 174 mg (quant), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 53.0 (*c* 0.5, MeOH).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K):  $\delta$  8.6 (s, 6 H, *NH*<sub>2</sub>), 8.25 (s, 6 H, *CH*-triazole), 5.29 (d, 6 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.3 Hz, H-1<sup>I-VI</sup>), 4.71 (bd, 6 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 13.6 Hz, H-6a<sup>I-VI</sup>), 4.65 (dd, 6 H, *J*<sub>5,6b</sub> = 3.8 Hz, H-6b<sup>I-VI</sup>), 4.35 (m, 6 H, H-5<sup>I-VI</sup>), 4.07 (s, 12 H, *CH*<sub>2</sub>*NH*<sub>2</sub>), 3.54, 3.40 (2 s, 36 H, OMe), 3.51 (t, 6 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.4 Hz, H-3<sup>I-VI</sup>), 3.33 (t, 6 H, H-4<sup>I-VI</sup>), 3.02 (dd, 6 H, H-2<sup>I-VI</sup>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  140.7 (Triazole-C4), 127.0 (Triazole-C5), 99.2 ( $\text{C}-1^{\text{I-VI}}$ ), 82.5 ( $\text{C}-4^{\text{I-VI}}$ ), 81.6 ( $\text{C}-2^{\text{I-VI}}$ ), 81.2 ( $\text{C}-3^{\text{I-VI}}$ ), 70.1 ( $\text{C}-5^{\text{I-VI}}$ ), 61.3, 58.2 (OMe), 50.8 ( $\text{C}-6^{\text{I-VII}}$ ), 34.6 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1643.7  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 842.2  $[\text{M} + \text{Cu} + \text{H}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{66}\text{H}_{114}\text{N}_{24}\text{O}_{24}\text{Cl}_6$ : C 43.07, H 6.24, N 18.27. Found: C 42.83, H 6.08, N 17.91.



**Hexakis{6-[4-(*N,N*-bis(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)aminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6-deoxy-2,3-di-*O*-methyl}cyclomaltohexaose (32).** To a solution of **74** (0.20 g, 0.15 mmol) in acetone (20 mL) was added **78** (0.38 g, 1.12 mmol, 1.2 eq.), DIPEA (0.16 mL, 0.93 mmol, 1.0 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (3 mg, 9  $\mu\text{mol}$ , 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum, the residue was taken in DCM (30 mL) and the solution was then washed with  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL). The organic layer was dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrated and concentrated

under reduced pressure to dryness. The resulting residue purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 314 mg (61%).  $R_f$  0.23 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +15.2$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.78 (s, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 6.21 (bs, 12 H,  $\text{NHBoc}$ ), 5.32 (d, 6 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I-VI}}$ ), 4.67, 4.54 (2 bd, 12 H,  $J_{6a,6b} = 14.6$  Hz,  $J_{5,6} = 3.8$  Hz,  $\text{H-6a}^{\text{I-VI}}$ ,  $\text{H-6b}^{\text{I-VI}}$ ), 4.20 (m, 6 H,  $\text{H-5}^{\text{I-VI}}$ ), 3.72 (bs, 12 H,  $\text{Triazole-CH}_2$ ), 3.53, 3.38 (2 s, 36 H, OMe), 3.52 (t, 6 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{I-VI}}$ ), 3.25 (t, 6 H,  $J_{4,5} = 9.0$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{I-VI}}$ ), 3.00, 2.97 (2 d, 12 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 2.93 (dd, 6 H,  $\text{H-2}^{\text{I-VI}}$ ), 2.47 (t, 12 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 1.37 (s, 108 H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  156.0 (CO), 143.8 ( $\text{Triazole-C4}$ ), 126.0 ( $\text{Triazole-C5}$ ), 98.7 ( $\text{C-1}^{\text{I-VI}}$ ), 81.7 ( $\text{C-4}^{\text{I-VI}}$ ), 81.6 ( $\text{C-2}^{\text{I-VI}}$ ), 81.3 ( $\text{C-3}^{\text{I-VI}}$ ), 78.0 (Cq), 70.1 ( $\text{C-5}^{\text{I-VI}}$ ), 61.1, 58.2 (OMe), 53.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 50.5 ( $\text{C-6}^{\text{I-VI}}$ ), 48.5 ( $\text{Triazole-CH}_2$ ), 39.0 ( $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 28.7 ( $\text{CMe}_3$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1693.3  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{+2}$ , 3339.8  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 3361.6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{150}\text{H}_{264}\text{N}_{36}\text{O}_{48}$ : C 53.94, H 7.97, N 15.10. Found: C 54.20, H 8.34, N 14.76.

**Hexakis{6-[4-(*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl)]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6-deoxy-2,3-di-*O*-methylcyclomaltohexaose (33)}**. Compound **33** was obtained from **32** (0.26 g, 77  $\mu\text{mol}$ ) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 0.23 g (quant).  $[\alpha]_D = +21.9$  ( $c$  1.0, DMSO).

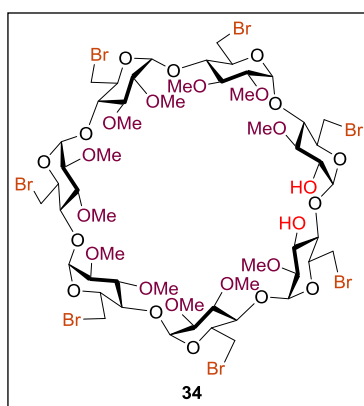
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.15 (s, 6 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 5.40 (d, 6 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I-VI}}$ ), 4.79, 4.69 (2 bd, 12 H,  $J_{6a,6b} = 12.9$  Hz,  $\text{H-6}^{\text{I-VI}}$ ), 4.29 (m, 6 H,  $\text{H-5}^{\text{I-VI}}$ ), 3.94, 3.88 (2 d, 12 H,  $J_{\text{H,H}} = 15.4$  Hz,  $\text{Triazole-CH}_2$ ), 3.80 (t, 6 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{I-VI}}$ ), 3.55, 3.38 (2 s, 36 H, OMe), 3.22 (t, 6 H,  $\text{H-4}^{\text{I-VI}}$ ), 3.13 (t, 12 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.07 (dd, 6 H,  $\text{H-2}^{\text{I-VI}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  140.6 (Triazole-C4), 128.0 (Triazole-C5), 97.5 (C-1<sup>I-VI</sup>), 80.6 (C-3<sup>I-VI</sup>), 79.9 (C-2<sup>I-VI</sup>), 79.7 (C-4<sup>I-VI</sup>), 69.9 (C-5<sup>I-VI</sup>), 60.6, 58.1 (OMe), 50.9 (C-6<sup>I-VI</sup>), 49.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 45.5 (Triazole- $\text{CH}_2$ ) 36.3 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1070.0  $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$ , 1088.9  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ , 1101.4  $[\text{M} + \text{H} + \text{Cu}]^{2+}$ , 734.5  $[\text{M} + 3 \text{Na}]^{3+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{90}\text{H}_{186}\text{N}_{36}\text{O}_{27}\text{Cl}_{12}$ : C 41.96, H 7.04, N 19.57. Found: C 41.63, H 7.08, N 18.99.

**Facially differentiated  $\beta$ -cyclodextrin derivatives.**



**6<sup>I-VII</sup>-Heptabromo-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-O-methylcyclomaltoheptaose (34).** To a solution of **69** (2.0 g, 1.13 mmol) in toluene (41 mL) at 0 °C, under  $\text{N}_2$  atmosphere, a solution of DIBAL-H (1.0 M in toluene, 10.21 mL, 10.21 mmol, 9.0 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 24 h under  $\text{N}_2$  atmosphere and then, quenched by addition of 1 M HCl (about 30 mL, until pH 1). The mixture was stirred vigorously in an ice bath, the organic phase was decanted and the aqueous layer was extracted with DCM ( $3 \times 40$  mL). The combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was

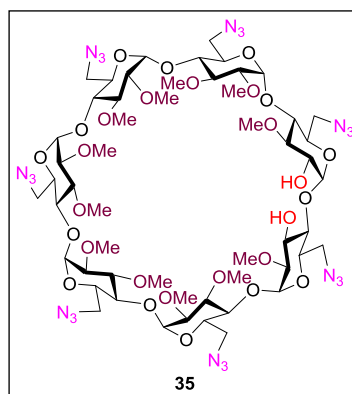
purified by column chromatography (50:1 → 20:1 DCM-MeOH). Yield: 0.88 g (45%), unreacted **69** (0.50 g, 25%).  $R_f$  0.53 (30:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +10.3$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.30, 5.23 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{III-VII}}$ ), 5.27 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{II}}$ ), 5.10 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 4.03-3.82 (m, 20 H,  $\text{H-5}^{\text{II-VII}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VII}}$ ), 4.01 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{I}}$ ), 4.00 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 3.74-3.46 (m, 46 H,  $\text{H-3}^{\text{III-VII}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{III-VII}}$ , OMe), 3.65 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz,  $\text{H-2}^{\text{I}}$ ), 3.58 (t, 1 H,  $J_{3,4} = 9.0$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{I}}$ ), 3.53 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ), 3.49 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.0$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{I}}$ ), 3.25 (t, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 3.25-3.20 (m, 5 H,  $\text{H-2}^{\text{III-VII}}$ ), 2.30 (bs, 2 H, OH).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  101.6 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 98.5-98.1 ( $\text{C-1}^{\text{II-VII}}$ ), 84.3, 83.0-80.7 ( $\text{C-2}^{\text{II-VII}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VII}}$ ), 73.2 ( $\text{C-2}^{\text{I}}$ ), 71.1 ( $\text{C-3}^{\text{II}}$ ), 71.5-70.5 ( $\text{C-5}^{\text{I-VII}}$ ), 61.6-61.3, 59.2-58.5 (OMe), 34.5-32.9 ( $\text{C-6}^{\text{I-VII}}$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1766.6  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

Anal. Calcd for  $\text{C}_{54}\text{H}_{87}\text{Br}_7\text{O}_{28}$ : C 37.20, H 5.06. Found: C 37.24, H 5.19.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptaazido-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-O-methylcyclomaltohexaose (35).** To a solution of **34** (64 mg, 36.7  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (3 mL),  $\text{NaN}_3$  (50 mg, 0.77 mmol, 3.0 eq.) was added. The reaction mixture was

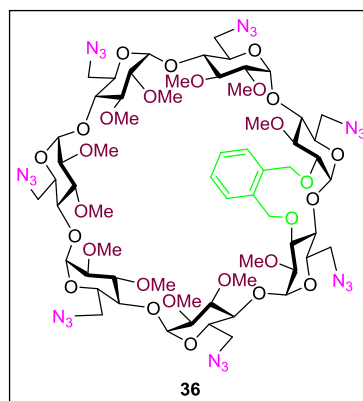
stirred at 60 °C for 16 h and then the solvent was evaporated under reduced pressure, the residue was taken into Et<sub>2</sub>O (10 mL) and washed with water (5 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and the solvent removed under vacuum to furnish **35**. Yield 56 mg (quant). R<sub>f</sub> 0.32 (20:1 DCM-MeOH). [α]<sub>D</sub> = +13.2 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.14 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  = 3.3 Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.14-5.08 (5 d, 5 H,  $J_{1,2}$  = 3.6 Hz, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.00 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  = 4.0 Hz, H-1<sup>I</sup>), 3.97 (t, 1 H,  $J_{2,3}$  =  $J_{3,4}$  = 9.4 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.89 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.87-3.78 (m, 5 H, H-5<sup>III-VII</sup>), 3.83-3.54 (m, 10 H, H-6<sup>III-VII</sup>), 3.81 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.76 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b}$  = 12.9 Hz, H-6a<sup>I</sup>), 3.74-3.43 (m, 10 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.73 (s, 3 H, OMe), 3.73 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b}$  = 12.1 Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.68 (dd, 1 H,  $J_{5,6b}$  = 3.6 Hz, H-6b<sup>I</sup>), 3.66-3.63 (5 s, 15 H, OMe), 3.63 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  = 9.2 Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.57 (dd, 1 H,  $J_{5,6b}$  = 3.9 Hz, H-6b<sup>II</sup>), 3.56-3.54 (6 s, 18 H, OMe), 3.54 (t, 1 H,  $J_{3,4}$  = 9.2 Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.53 (t, 1 H,  $J_{4,5}$  = 9.4 Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.45 (t, 1 H,  $J_{4,5}$  = 9.2 Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.24-3.18 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 3.21 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 101.7 (C-1<sup>I</sup>), 99.0-98.6 (C-1<sup>II-VII</sup>), 82.9-80.7 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 73.2 (C-2<sup>I</sup>), 71.8 (C-5<sup>II</sup>), 71.6 (C-3<sup>II</sup>), 71.0-70.4 (C-5<sup>I,III-VII</sup>), 62.1, 61.6-61.3, 59.0-58.6 (OMe), 51.951.3 (C-6<sup>I-VII</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1500.6 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>54</sub>H<sub>87</sub>N<sub>21</sub>O<sub>28</sub>: C 43.87, H 5.93, N 19.90. Found: C 43.98, H 6.11, N 19.77.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptaazido-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*o*-xylylene)-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-**

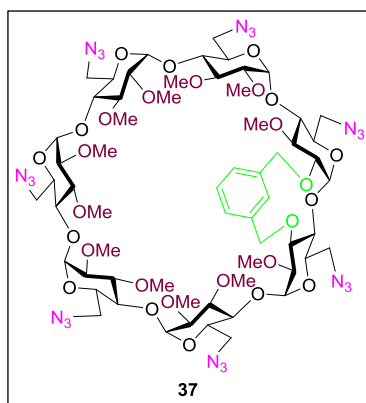
**dodeca-O-methylcyclomaltoheptaose (36).** A solution of freshly lyophilized **35** (0.20 g, 0.14 mmol) in dry DMF (4 mL), under N<sub>2</sub> atmosphere, was added to a suspension of NaH (19.5 mg, 0.81 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (1 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of α,α'-dibromo-*o*-xylylene (53.2 mg, 0.20 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (1 mL) was added and the reaction mixture was further stirred at rt for 16 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (1.2 mL), concentrated and the residue purified by column chromatography (50:1 → 30:1 DCM-MeOH). Yield 136 mg (64%). R<sub>f</sub> 0.63 (30:1 DCM-MeOH). [α]<sub>D</sub> = + 11.9 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.31 (bs, 4 H, Ph), 5.34 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 4.3 Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.27 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.9 Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.25, 4.74 (2 d, 4 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.21, 5.20, 5.15 (5 d, 5 H, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.14, 4.55 (2 d, 4 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 10.3 Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 3.98-3.78 (m, 17 H, H-5<sup>III-VII</sup>, H-6b<sup>I,II</sup>, H-6<sup>III-VII</sup>), 3.94 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.86 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.86 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 12.4 Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.76 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 10.2 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.72-3.51 (m, 46 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>, OMe), 3.67 (bd, 1 H, *J*<sub>6a,6b</sub> = 13.4 Hz, H-6a<sup>I</sup>), 3.56 (t, 1 H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 9.2 Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.53 (t, 1 H, *J*<sub>4,5</sub> = 10.2 Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.50 (t, 1 H, H-3<sup>I</sup>), 3.44 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.2 Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.27-3.20 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 3.27 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta$  137.1, 130.5, 129.7, 127.9, 127.8 (Ph), 99.3 (C-1<sup>I</sup>), 98.6-97.8 (C-1<sup>II-VII</sup>), 82.4-79.3 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 80.6 (C-3<sup>II</sup>), 78.7 (C-2<sup>I</sup>), 75.2 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.1-70.1 (C-5<sup>I-VII</sup>, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 61.0-60.4, 58.1-57.6 (OMe), 50.8-50.7 (C-6<sup>I-VII</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1602.5 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd for C<sub>62</sub>H<sub>93</sub>N<sub>21</sub>O<sub>28</sub>: C 47.11, H 5.93, N 18.61. Found: C 47.34, H 6.11, N 18.43.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptaazido-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*m*-xylylene)-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-**

**dodeca-O-methylcyclomaltoheptaose (37).** A solution of freshly lyophilized **35** (0.20 g, 0.14 mmol) in dry DMF (4 mL), under N<sub>2</sub> atmosphere, was added to a suspension of NaH (19.5 mg, 0.81 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (1 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xylene (53.2 mg, 0.20 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (1 mL) was added and the reaction mixture was further stirred at rt for 16 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl (1.2 mL), concentrated and the residue purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  30:1 DCM-MeOH). Yield 136 mg (64%).  $R_f$  0.63 (30:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +12.7$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).



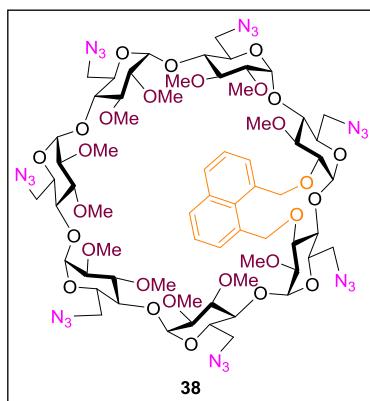
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.93 (bs, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.38 (m, 2 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4,5}}$ ), 7.25 (m, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-6}}$ ), 5.28, 4.24 (2 d, 4 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.3$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 5.18, 5.16, 5.11, 5.07, 5.00 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{III-VII}}$ ), 5.00 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{II}}$ ), 4.89, 4.53 (2 d, 4 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.7$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.24 (d, 1 H,  $J_{2,3} = 3.5$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 3.93-3.59 (m, 42 H,  $\text{H-5}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VII}}$ ,  $7 \times \text{OMe}$ ), 3.86 (m, 1 H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 3.77 (dd, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 3.58-3.33 (m, 27 H,  $\text{H-3}^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I,III-VII}}$ ,  $5 \times \text{OMe}$ ), 3.50-3.10 (m, 6 H,  $\text{H-2}^{\text{I,III-VII}}$ ), 1.82 (bs, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{MeOD}$ ):  $\delta$  8.02 (bs, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.41 (t, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz,  $\text{Ph}_{\text{H-5}}$ ), 7.36, 7.33 (2 bd, 2 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4,6}}$ ), 5.35 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.9$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{VI}}$ ), 5.24, 4.37 (2 d, 4 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.3$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 5.19 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.4$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{II}}$ ), 5.15, 5.17 (2d, 2 H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{V,VII}}$ ), 5.13, 5.11 (2d, 2 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{III,IV}}$ ), 4.87, 4.63 (2 d, 4 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.7$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.30 (d, 1 H,  $J_{2,3} = 4.20$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 3.93-3.25 (m, 14 H,  $\text{H-3}^{\text{III-V}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{III-V}}$ ,  $\text{H-5}^{\text{I,IV-VI}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I,IV-VI}}$ ), 3.94 (dd, 1 H,  $J_{5,6a} = 4.2$  Hz,  $J_{6a,6b} = 13.2$  Hz,  $\text{H-6a}^{\text{VII}}$ ), 3.93 (m, 1 H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 3.87 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{VII}}$ ), 3.85 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{II}}$ ), 3.78 (dd, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 3.79 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.7$  Hz,  $\text{H-6a}^{\text{III}}$ ), 3.78 (m, 2 H,  $\text{H-6a}^{\text{I}}$ ,  $\text{H-6b}^{\text{I}}$ ), 3.72, 3.67 (2s, 6 H,  $\text{OMe}$ ) 3.68 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{III}}$ ), 3.65 (2 s, 6 H,  $\text{OMe}$ ), 3.63 (2s, 6 H,  $\text{OMe}$ ), 3.62 (t, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.2$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{VII}}$ ), 3.61 (s, 3 H,  $\text{OMe}$ ), 3.59 (m, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{VI}}$ ), 3.58 (t (1 H,  $J_{2,3} = 9.2$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{VII}}$ ), 3.58, 3.55, 3.54 (3s, 9 H,  $\text{OMe}$ ), 3.54 (m, 1 H,  $\text{H-6a}^{\text{II}}$ ), 3.52, 3.50 (2s, 6 H,  $\text{OMe}$ ), 3.50 (m, 2 H,  $\text{H-3}^{\text{I}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I}}$ ), 3.48 (m, 1 H,  $\text{H-3}^{\text{VI}}$ ), 3.40-3.19 (m, 2 H,  $\text{H-2}^{\text{III,IV}}$ ), 3.39 (m, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{I}}$ ), 3.36 (m, 1 H,  $\text{H-6b}^{\text{III}}$ ), 3.25 (m, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{VI}}$ ), 3.23 (m, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{V}}$ ), 3.21 (dd, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{VII}}$ ), 3.09 (dd, 1 H,  $J_{5,6b} = 6.4$  Hz,  $J_{6a,6b} = 13.0$  Hz,  $\text{H-6b}^{\text{II}}$ ), 1.89 (bs, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  140.4 ( $\text{Ph}_{\text{C-2}}$ ), 137.5, 130.3, 129.3, 126.6 ( $\text{Ph}_{\text{C-1,3-6}}$ ), 99.7 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 99.3-98.6 ( $\text{C-1}^{\text{II-VII}}$ ), 84.0-79.8 ( $\text{C-2}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I,III-VII}}$ ), 80.6 ( $\text{C-4}^{\text{II}}$ ), 75.3 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 73.7 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 72.5 ( $\text{C-5}^{\text{II}}$ ), 71.2-70.0 ( $\text{C-5}^{\text{I,III-VII}}$ ), 61.6-61.0, 59.3-57.9 ( $\text{OMe}$ ), 53.6, 53.4, 51.7-51.5 ( $\text{C-6}^{\text{I-VII}}$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1602.4  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

Anal. Calcd for  $C_{62}H_{93}N_{21}O_{28}$ : C 47.11, H 5.93, N 18.61. Found: C 46.87, H 5.82, N 18.34.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptaazido-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>I,3<sup>II</sup></sup>-O-(1,8-dimethylnaphthylene)-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-O-methylcyclomaltoheptaose (38).** A solution of freshly lyophilized **35** (0.11 g, 0.08 mmol) in dry DMF (3 mL), under  $N_2$  atmosphere, was added to a suspension of NaH (11.4 mg, 0.45 mmol, 3.0 eq.) in dry DMF (1.2 mL) and the mixture was stirred at rt for 30 min. Then, a solution of 1,8-bis(bromomethyl)naphthalene (35.4 mg, 0.11 mmol, 1.5 eq.) in dry DMF (0.5 mL) was added and the reaction mixture was stirred under  $N_2$  atmosphere at rt for 16 h. Then, the reaction was quenched by addition of 1 M HCl until neutral pH (ca. 1 mL) and concentrated to dryness. The residue was taken in  $Et_2O$  (10 mL) and the solution was then washed with  $H_2O$  (10 mL). The organic layer was dried ( $Na_2SO_4$ ), filtrated and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting residue was purified by column chromatography (100:1  $\rightarrow$  50:1 DCM-MeOH). Yield 101 mg (83%).  $R_f$  0.39 (50:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +15.5$  ( $c$  1.0,  $CHCl_3$ ).

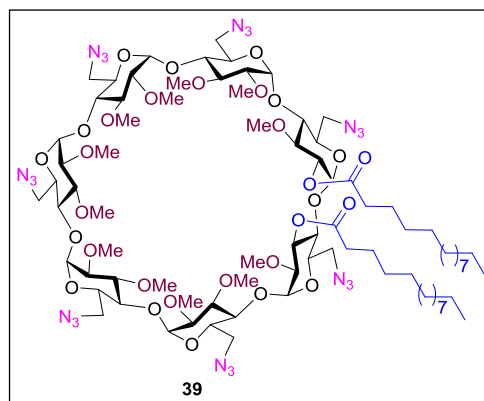
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.91 (dd, 1 H,  $^3J_{H,H} = 4.1$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-5</sub>), 7.89 (dd, 1 H,  $^3J_{H,H} = 4.1$  Hz, Naphth<sub>H-4</sub>), 7.67 (dd, 1 H,  $^3J_{H,H} = 7.1$  Hz,

$^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-7</sub>), 7.60 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-2</sub>), 7.50 (t, 1 H, Naphth<sub>H-6</sub>), 7.47 (t, 1 H, Naphth<sub>H-3</sub>), 6.29, 4.66 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.9$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.75, 4.53 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.4$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.27 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.0$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.20-5.13 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.8$  Hz, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.08 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 3.96-3.45 (m, 15 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>, H-6a<sup>III-VII</sup>, H-6b<sup>III-VII</sup>), 3.96-3.70 (m, 5 H, H-5<sup>III-VII</sup>), 3.90 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.87 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.79 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.77 (s, 3 H, OMe), 3.76 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.1$  Hz, H-6a<sup>II</sup>), 3.69, 3.68, 3.66 (3 s, 9 H, OMe), 3.66 (m, 2 H, H-6a<sup>I</sup>, H-6b<sup>I</sup>), 3.65 (t, 1 H,  $J_{3,4} = 9.0$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.65, 3.64 (2 s, 6 H, OMe), 3.61 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.0$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.60 (dd, 1 H,  $J_{5,6b} = 4.1$  Hz, H-6b<sup>II</sup>), 3.59, 3.57, 3.55 (3 s, 9 H, OMe), 3.55 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.54, 3.53, 3.52 (3 s, 9 H, OMe), 3.51 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 8.9$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.22 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.29-3.20 (6 dd, 6 H,  $J_{2,3} = 9.2$ , H-2<sup>III-VII</sup>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  135.5, 133.7, 133.4, 132.7 (Naphth<sub>C-1,8-10</sub>), 133.6 (Naphth<sub>C-7</sub>), 133.1 (Naphth<sub>C-2</sub>), 130.8 (Naphth<sub>C-4,5</sub>), 125.3-125.1 (Naphth<sub>C-3,6</sub>), 100.7 (C-1<sup>I</sup>), 98.9-98.4 (C-1<sup>II-VII</sup>), 84.8 (C-2<sup>I</sup>), 81.8-79.8 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 77.1 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>I</sup>), 71.7 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>II</sup>), 71.1-70.4 (C-5<sup>I-VII</sup>), 61.7-58.7 (OMe), 51.9-51.6 (C-6<sup>I-VII</sup>).

ESI-MS:  $m/z$  1652.5 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>66</sub>H<sub>95</sub>N<sub>21</sub>O<sub>28</sub>: C 48.61, H 5.87, N 18.04. Found: C 48.80, H 6.01, N 17.92.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptaazido-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-di-O-myristoyl-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-**

**dodeca-O-methylcyclomaltoheptaose (39).** A solution of **35** (0.17 g, 0.11 mmol), DMAP (27 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) and myristic anhydride (0.41 g, 0.89 mmol, 4.0 eq.) in DMF (12 mL) was stirred at 0 °C for 1 h. The mixture was stirred at rt for 48 h. Then, the solvent was removed under vacuum and the resulting residue was dissolved in 95:5 DCM-MeOH (70 mL) and was refluxed for 1 h. The solution was then washed with H<sub>2</sub>O (2 x 50 mL), aqueous 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 x 50 mL) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution (2 x 50 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrated and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (1:2 → 1:1 EtOAc-petroleum ether). Yield 197 mg (93%). R<sub>f</sub> 0.78 (1:1 EtOAc-petroleum ether). [α]<sub>D</sub> = + 9.75 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

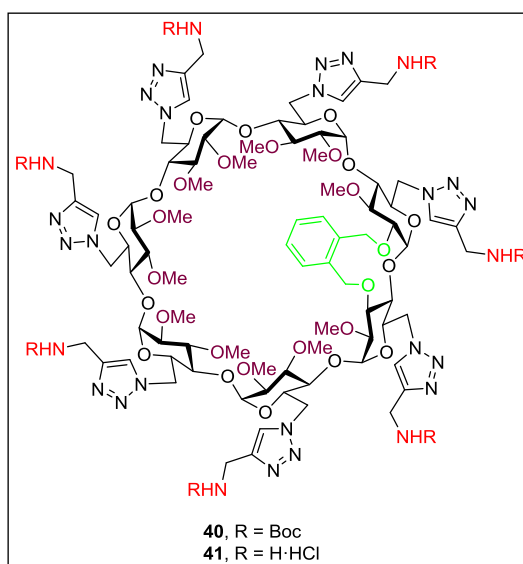
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 5.39 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.7$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 5.30 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.11, 5.10, 5.06, 5.05, 5.04 (d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.1$  Hz, H-1<sup>III-VII</sup>), 4.98 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 4.66 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.3$  Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.91-3.66 (m, 5 H, H-5<sup>III-VII</sup>), 3.88 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.82-3.45 (m, 10 H, H-6a<sup>III-VII</sup>, H-6b<sup>III-VII</sup>), 3.80, 3.69 (m, 3 H, H-5<sup>II</sup>, H-6<sup>II</sup>), 3.76 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.0$  Hz, H-6a<sup>I</sup>), 3.68-3.43 (m, 10 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.66, 3.64, 3.63, 3.61 (4 s, 12 H, OMe), 3.60 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.7$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.57 (s, 3 H, OMe), 3.56 (dd, 1 H,  $J_{5,6} = 5.4$  Hz, H-6b<sup>I</sup>), 3.54, 3.53, 3.52, 3.52 (4 s, 12 H, OMe), 3.49 (m, 2 H, H-3<sup>I</sup>, H-4<sup>I</sup>), 3.49, 3.49, 3.48,

3.46 (4 s, 12 H, OMe), 3.22 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.20-3.15 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 2.45-2.29 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-2), 1.75-1.59 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-3), 1.38-1.20 (m, 20 H, CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 0.90-0.85 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>-14).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.1, 172.8 (CO), 99.0-98.6 (C-1<sup>III-VII</sup>), 98.1 (C-1<sup>I</sup>), 96.7 (C-1<sup>I</sup>), 82.0-77.7 (C-2<sup>III-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 79.5 (C-2<sup>II</sup>), 73.1 (C-2<sup>I</sup>), 71.3-70.6 (C-3<sup>II</sup>, C-5<sup>I-VII</sup>), 61.7-60.9, 59.2-58.3 (OMe), 51.9-51.2 (C-6<sup>I-VII</sup>), 34.7-33.4 (CH<sub>2</sub>-2), 31.9, 29.6-29.2, 22.7 (CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 25.1-24.8 (CH<sub>2</sub>-3), 14.1 (CH<sub>3</sub>-14).

ESI-MS: *m/z* 1920.7 [M + Na]<sup>+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>82</sub>H<sub>139</sub>N<sub>21</sub>O<sub>30</sub>: C 51.86, H 7.38, N 15.49. Found: C 52.02, H 7.53, N 15.24.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis[4-(*tert*-butoxycarbonylamino)methyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose (40).** To a solution of **36** (96 mg, 61 μmol) in acetone (10 mL) was added **77** (119 mg, 0.76 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (109 μL,

0.64 mmol, 1.5 eq.) and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (2 mg, 5  $\mu\text{mol}$ , 15 meq.) and the mixture was stirred at reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (10 mL) and washed with water (5 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The resulting residue was purified by column chromatography using 50:1  $\rightarrow$  10:1 DCM-MeOH as eluent. Yield 84 mg (52%).  $R_f$  0.63 (30:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +24.0$  (c 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.70-7.64 (7 s, 7 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 7.28-7.26 (m, 4 H, Ph), 6.95 (bs, 7 H,  $\text{NHBoc}$ ), 5.49-5.42 (m, 5 H,  $\text{H-1}^{\text{III-VII}}$ ), 5.44 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 5.30 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.9$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 5.12, 4.67, (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.8$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ), 4.93, 4.58 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 10.9$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 4.75-4.40 (m, 14 H,  $\text{H-6}^{\text{III-VII}}$ ), 4.70, 4.59 (2 bd, 2 H,  $J_{6a,6b} = 9.2$  Hz,  $\text{H-6}^{\text{I}}$ ), 4.53 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 12.4$  Hz,  $\text{H-6a}^{\text{II}}$ ), 4.44 (m, 1 H,  $\text{H-6b}^{\text{II}}$ ), 4.26 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{II}}$ ), 4.15-4.06 (m, 19 H,  $\text{H-5}^{\text{III-VII}}$ ,  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 3.73 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 4.09 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{I}}$ ), 3.57-3.22 (m, 46 H,  $\text{H-3}^{\text{III-VII}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{III-VII}}$ , OMe), 3.47 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz,  $\text{H-3}^{\text{I}}$ ), 3.38 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.4$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ), 3.35 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.2$  Hz,  $\text{H-4}^{\text{I}}$ ), 3.21 (dd, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{I}}$ ), 3.12 (dd, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 3.09-2.98 (m, 5 H,  $\text{H-2}^{\text{III-VII}}$ ), 1.38-1.30 (7s, 63 H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  156.0 (CO), 145.8 (Triazole-C4), 137.7, 131.2, 130.2, 128.4 (Ph), 124.9 (Triazole-C5), 99.2 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 98.3-97.8 ( $\text{C-1}^{\text{II-VII}}$ ), 81.9-80.5 ( $\text{C-2}^{\text{II-VII}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VII}}$ ), 78.5 (Cq,  $\text{C-2}^{\text{I}}$ ), 75.1 ( $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ), 71.5 ( $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 70.0-69.8 ( $\text{C-5}^{\text{I-VII}}$ ), 61.6-60.9, 58.6-58.2 (OMe), 50.4-50.1 ( $\text{C-6}^{\text{I-VII}}$ ), 36.3 ( $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 28.6 ( $\text{CMe}_3$ ).

ESI-MS:  $m/z$  2729.9  $[\text{M} + \text{Cu}]^+$ , 2688.9  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .

Anal. Calcd for  $\text{C}_{118}\text{H}_{184}\text{N}_{28}\text{O}_{42}$ : C 53.14, H 6.95, N 14.71, O 25.20. Found C 53.21, H 7.13, N 14.53.

**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose (41).**

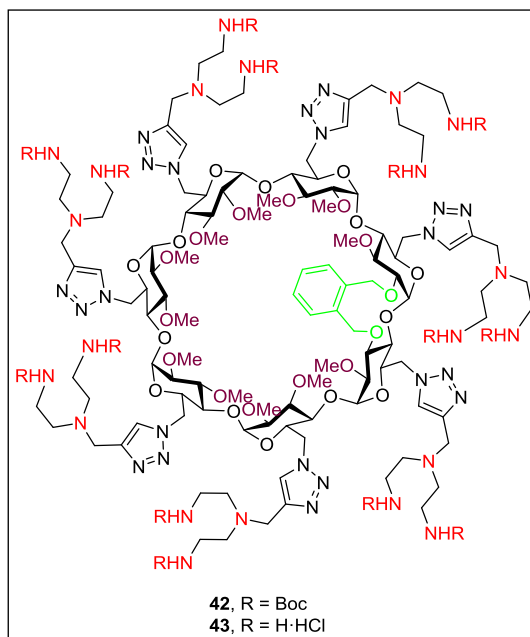
Compound **41** was obtained from **40** (29 mg, 11  $\mu$ mol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 25 mg (quant).  $[\alpha]_D = +31.7$  (c 1.0, MeOH).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 343 K):  $\delta$  8.57 (bs, 14 H,  $\text{NH}_2$ ), 8.20-8.12 (7 s, 7 H,  $\text{CH}$ -triazole), 7.31-7.26 (m, 4 H, Ph), 5.46-5.39 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz H-1<sup>III-VII</sup>), 5.42 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.33 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.8$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.07, 4.69 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.1$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.94, 4.62 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.0$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 4.85 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.5$  Hz, H-6a<sup>I</sup>), 4.81-4.42 (m, 10 H, H6<sup>III-VII</sup>), 4.60 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.0$  Hz, H-6a<sup>II</sup>), 4.55 (bd, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 4.45 (bd, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 4.31 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.31-3.89 (m, 5 H, H-5<sup>III-VII</sup>), 4.13 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 4.11-3.88 (m, 14 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.73 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.58-3.30 (m, 10 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.57-3.40 (12 s, 36 H, OMe), 3.42, 3.48 (2 t, 2 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$  Hz, H-3<sup>I</sup>, H-4<sup>I</sup>), 3.41 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.3$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.26 (dd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.15 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.16-3.07 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 323 K):  $\delta$  140.0 (Triazole-C4), 136.7, 136.5 ( $\text{Ph}_{\text{C-1,2}}$ ), 131.7-127.7 ( $\text{Ph}_{\text{C-3-6}}$ ), 127.8 (Triazole-C5), 99.2 (C-1<sup>I</sup>), 98.4-97.9 (C-1<sup>II-VII</sup>), 81.4-79.5 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 77.2 (C-2<sup>I</sup>), 74.9 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 71.4 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 71.0-69.2 (C-5<sup>I-VII</sup>), 61.3-58.3 (OMe), 51.3-50.6 (C-6<sup>I-VII</sup>), 34.3 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1988.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1005.8  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{83}\text{H}_{135}\text{N}_{28}\text{O}_{28}\text{Cl}_7$ : C 44.88, H 6.13, N 17.66. Found: C 44.55, H 5.90, N 17.39.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose (42).** To a solution of **36** (60 mg, 38  $\mu$ mol) in acetone (7 mL) was added **78** (109 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.), DIPEA (46  $\mu$ L, 0.27 mmol, 1.0 eq.), and CuI·(EtO)<sub>3</sub>P (1 mg, 3  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (10 mL) and washed with water (8 mL). The organic layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 114 mg (76%). *R*<sub>f</sub> 0.31 (20:1 DCM-MeOH). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 24.0 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K):  $\delta$  7.85-7.78 (7 s, 7 H, *CH*-triazole), 7.29-7.23 (m, 4 H, Ph), 6.21 (bs, 14 H, *NH*Boc), 5.43-5.39 (m, 6 H, H-1<sup>II-VII</sup>), 5.29



(m, 1 H, H-1<sup>I</sup>), 5.09, 4.66 (2 d, 2 H,  $^2J_{H,H} = 7.9$  Hz, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.95, 4.54 (2 d, 2 H,  $^2J_{H,H} = 10.0$  Hz, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 4.73-4.19 (m, 21 H, H-6<sup>I-VII</sup>, H-5<sup>I-VII</sup>), 3.83-3.56 (m, 14 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.85-2.93 (m, 18 H, H-4<sup>II-VII</sup>, H-3<sup>II-VII</sup>, H-2<sup>II-VII</sup>), 3.48, 3.29 (2 t, 2 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = J_{4,5} = 8.7$  Hz, H-3<sup>I</sup>, H-4<sup>I</sup>), 3.55-3.38 (12 s, 36 H, OMe), 3.18 (bd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.06-2.95 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.55-2.42 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 1.40-1.35 (m, 126 H, CMe<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K): δ 156.0 (CO), 143.8 (Triazole-C4), 137.6-125.7 (Ph), 125.9 (Triazole-C5), 99.4-97.9 (C-1<sup>I-VII</sup>), 82.1-75.0 (C-2<sup>I-VII</sup>, C-3<sup>I-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 78.1 (Cq), 74.7 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 74.0-69.4 (PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>, C-5<sup>I-VII</sup>), 61.4-58.2 (OMe), 53.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 50.4 (C-6<sup>I-VII</sup>), 48.5 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 39.0 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 28.7 (CMe<sub>3</sub>).

ESI-MS: *m/z* 3991.6 [M + Na]<sup>+</sup>, 2008.6 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>181</sub>H<sub>310</sub>N<sub>42</sub>O<sub>56</sub>: C 54.75, H 7.87, N 14.82. Found: C 54.39, H 7.57, N 14.48.

**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-(*o*-xylylene)cyclomaltoheptaose (43).** Compound **43** was obtained from **42** (87 mg, 22 μmol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 73 mg (quant). [α]<sub>D</sub> = + 10.8 (c 1.0, H<sub>2</sub>O).

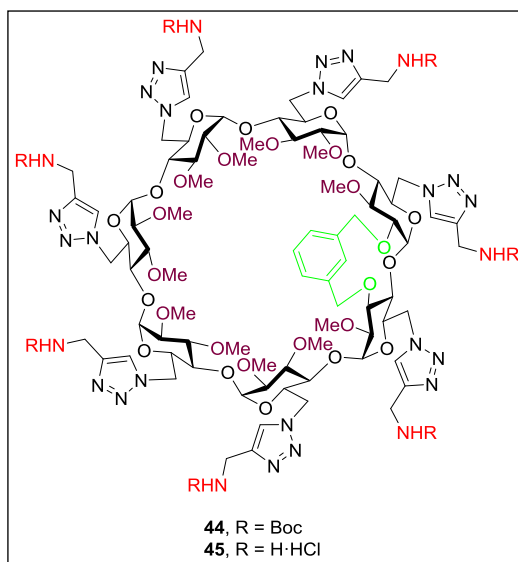
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.14-8.00 (7 s, 7 H, CH-triazole), 7.33-7.25 (m, 4 H, Ph), 5.60-5.54 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz H-1<sup>III-VII</sup>), 5.58 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.24 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.1$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.08-4.70 (m, 10 H, H6<sup>III-VII</sup>), 5.01, 4.84 (2 m, 2 H, PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.98 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.8$  Hz, H-6a<sup>I</sup>), 4.91, 4.73 (2 m, 2 H, PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 4.83 (bd, 1 H,  $J_{6a,6b} = 13.0$  Hz, H-6a<sup>II</sup>), 4.87 (bd, 1 H, H-6b<sup>I</sup>), 4.71 (bd, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 4.44 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.38-4.30 (m, 5 H, H-5<sup>III-VII</sup>), 4.24 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.93 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.4$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.92-3.78 (m, 14 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.81-3.00 (m, 15 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>, H-2<sup>III-VII</sup>), 3.69-3.47 (12 s, 36 H, OMe), 3.61

(t, 1 H,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.2$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.29 (t, 1 H,  $J_{2,3} = 9.2$ , H-3<sup>I</sup>), 3.21-3.06 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.17 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.4$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.17 (dd, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.08 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 2.85-2.73 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, MeOD):  $\delta$  141.8-141.5 (Triazole-C4), 137.3, 136.8 (Ph<sub>C-1,2</sub>), 131.0-126.5 (Ph<sub>C-3-6</sub>), 126.9 (Triazole-C5), 98.8 (C-1<sup>I</sup>), 98.2-97.8 (C-1<sup>II-VII</sup>), 82.1-79.5 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>II-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 78.3 (C-3<sup>I</sup>), 77.6 (C-2<sup>I</sup>), 74.8 (PhCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.7 (PhCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 70.1-68.8 (C-5<sup>I-VII</sup>), 61.2-57.3 (OMe), 50.3 (C-6<sup>I-VII</sup>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 45.6 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  2569.1 [M + H]<sup>+</sup>, 1285.0 [M + 2 H]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>111</sub>H<sub>219</sub>N<sub>42</sub>O<sub>28</sub>Cl<sub>21</sub>: C 39.98, H 6.62, N 17.64. Found: C 39.70, H 6.37, N 17.35.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*m*-xylylene)cyclomaltoheptaose (44).** To a solution of **37** (77 mg, 49  $\mu$ mol) in acetone (9 mL) was added **77** (95 mg, 0.61 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (117  $\mu$ L, 0.68

mmol, 2.0 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (1 mg, 3  $\mu\text{mol}$ , 10 meq.) and the mixture was stirred at reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (10 mL) and washed with water (5 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum and the resulting residue purified by column chromatography using 50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH as eluent. Yield 61 mg (47%).  $R_f$  0.63 (30:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +10.8$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.93, 7.75-7.68 (7 s, 7 H,  $\text{CH}$ -triazole), 7.50 (bs, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.21, 7.25 (2 m, 3 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4-6}}$ ), 6.95-6.65 (m, 7 H,  $\text{NH}\text{Boc}$ ), 5.40-5.24 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{III-VII}}$ ), 5.12, 4.30 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.0$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 5.00 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 2.5$  Hz,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 4.84-3.70 (m, 35 H,  $\text{CH}_2\text{NH}\text{Boc}$ ,  $\text{H-5}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VII}}$ ), 4.73, 4.63 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.8$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.33 (m, 1 H,  $\text{H-3}^{\text{II}}$ ), 3.94 (m, 1 H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 3.75 (m, m, 1 H,  $\text{H-2}^{\text{II}}$ ), 3.60-3.24 (m, 49 H,  $\text{H-3}^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{H-2}^{\text{I}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I,III-VII}}$ , 12 OMe), 3.20-2.90 (m, 5 H,  $\text{H-2}^{\text{III-VII}}$ ), 1.78 (bs, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ), 1.39-1.29 (7 s, 56 H,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  155.9 (CO), 145.9 (Triazole-C4), 140.5, 129.6 (Ph), 125.2 (Triazole-C5), 99.1 ( $\text{C-1}^{\text{I-VII}}$ ), 82.1-81.0 ( $\text{C-2}^{\text{II-VII}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VII}}$ ), 78.7, 78.4 (Cq,  $\text{C-2}^{\text{I}}$ ), 74.3 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 73.0 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 71.0-69.3 ( $\text{C-5}^{\text{I-VII}}$ ), 61.2-60.7, 59.1-58.0 (OMe), 50.8-49.6 ( $\text{C-6}^{\text{I-VII}}$ ), 36.2 ( $\text{CH}_2\text{NH}\text{Boc}$ ), 28.6 ( $\text{CMe}_3$ ).

ESI-MS:  $m/z$  2688.9  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1355.8  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd for  $\text{C}_{118}\text{H}_{184}\text{N}_{28}\text{O}_{42}$ : C 53.14, H 6.95, N 14.71, O 25.20. Found: 53.35, H 7.12, N 14.48.

**$6^{\text{I-VII}}$ -Heptakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]- $6^{\text{I-VII}}$ -heptadeoxy- $2^{\text{II-VII}}$ , $3^{\text{I,III-VII}}$ -dodeca-*O*-methyl- $2^{\text{I}}$ , $3^{\text{II}}$ -*O*-(*m*-xylylene)cyclomaltoheptaose (45).**

Compound **45** was obtained from **44** (62 mg, 23  $\mu\text{mol}$ ) using the procedure

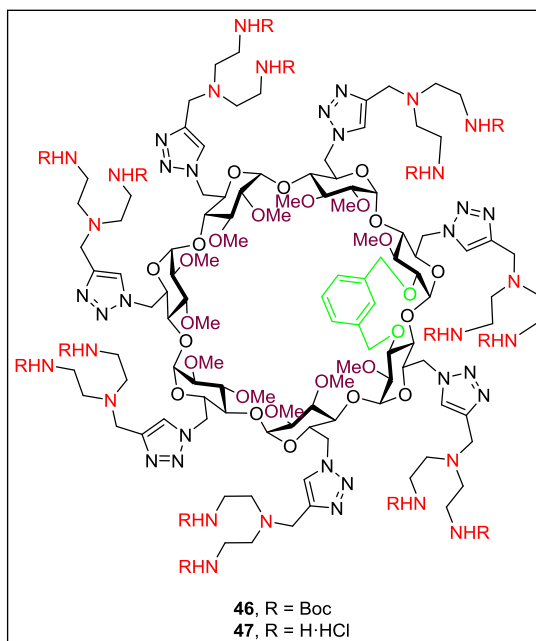
described in General Methods (Boc cleavage). Yield 56 mg (quant).  $[\alpha]_D = +16.7$  (c 1.0, DMSO).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 323 K):  $\delta$  8.43-8.23 (7 s, 7 H, CH-triazole), 8.02 (bs, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.57-7.52 (m, 2 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4,5}}$ ), 7.20 (bd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz,  $\text{Ph}_{\text{H-6}}$ ), 5.64-5.38 (m, 6 H,  $\text{H-1}^{\text{II-VII}}$ ), 5.41, 4.51 (d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.4$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 5.03-4.17 (m, 37 H,  $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{H-5}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{H-6}^{\text{I-VII}}$ ), 4.33 (m, 1 H,  $\text{H-5}^{\text{II}}$ ), 4.28-3.37 (m, 20 H,  $\text{H-2}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{H-3}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{H-4}^{\text{I,III-VII}}$ ), 4.21 (m, 1 H,  $\text{H-1}^{\text{I}}$ ), 3.86-3.63 (12 s, 36 H, OMe), 1.63 (bs, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 323 K): 140.3 (Triazole-C4), 136.8-127.3 (Ph, Triazole-C5), 99.9 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 98.9-97.6 ( $\text{C-1}^{\text{II-VII}}$ ), 82.2-75.0 ( $\text{C-2}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ), 73.3 ( $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 71.2-69.3 ( $\text{C-5}^{\text{I-VII}}$ ), 60.9-58.1 (OMe), 51.8-50.6 ( $\text{C-6}^{\text{I-VII}}$ ), 34.3 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  1965.6  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 1015.2  $[\text{M} + \text{Cu} + \text{H}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{83}\text{H}_{135}\text{N}_{28}\text{O}_{28}\text{Cl}_7$ : C 44.88, H 6.13, N 17.66. Found: C 44.35, H 5.88, N 17.43.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*m*-**

**xylylene)cyclomaltoheptaose (46).** To a solution of **37** (83 mg, 53  $\mu$ mol) in acetone (10 mL) was added **78** (226 mg, 0.66 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (94  $\mu$ L, 0.55 mmol, 1.5 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (1 mg, 4  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (12 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 140 mg (67%).  $R_f$  0.24 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +10.0$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  8.00-7.80 (m, 8 H, *CH*-triazole,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.26 (t, 1 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz,  $\text{Ph}_{\text{H-5}}$ ), 7.22 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4}}$ ), 6.97 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-}}$

$\delta$ ), 6.45-6.19 (m, 14 H,  $\text{NH}(\text{Boc})$ ), 5.42-5.28 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.0$  Hz,  $\text{H}-1^{\text{III-VII}}$ ), 5.11, 4.24 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.8$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 5.07 (bs, 1 H,  $\text{H}-1^{\text{II}}$ ), 4.72-3.68 (m, 25 H,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ,  $\text{H}-5^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{H}-6^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{H}-3^{\text{II}}$ ,  $\text{H}-1^{\text{I}}$ ), 3.92-3.07 (m, 14 H, Triazole- $\text{CH}_2$ ), 3.58-3.36 (12 s, 36 H, OMe), 3.98-2.32 (m, 18 H,  $\text{H}-2^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{H}-3^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{H}-4^{\text{I,III-VII}}$ ), 3.71 (m, 1 H,  $\text{H}-2^{\text{II}}$ ), 3.20-2.93 (m, 14 H,  $\text{CH}_2\text{NH}(\text{Boc})$ ), 2.80-2.33 (m, 14 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{Boc})$ ), 1.52-1.22 (m, 127 H,  $\text{H}-4^{\text{II}}$ ,  $\text{CMe}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 323 K):  $\delta$  156.0 (CO), 153.8-140.5 (Triazole- $\text{C}_4$ ,  $\text{Ph}_{\text{C-1,3}}$ ), 129.7-125.8 ( $\text{Ph}_{\text{C-2,4-6}}$ , Triazole- $\text{C}_5$ ), 99.3-98.2 ( $\text{C}-1^{\text{I-VII}}$ ), 82.2-74.3 ( $\text{C}-2^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C}-3^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{C}-4^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 78.2 (Cq), 72.3 ( $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 71.6-69.3 ( $\text{C}-5^{\text{I-VII}}$ ), 61.1-57.9 (OMe), 53.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{Boc})$ ), 50.2 ( $\text{C}-6^{\text{I-VII}}$ ), 48.1 (Triazole- $\text{CH}_2$ ), 38.9-37.9 ( $\text{CH}_2\text{NH}(\text{Boc})$ ), 28.7 ( $\text{CMe}_3$ ).

ESI-MS:  $m/z$  3993.9  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 2007.4  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{181}\text{H}_{310}\text{N}_{42}\text{O}_{56}$ : C 54.75, H 7.87, N 14.82. Found: C 54.91, H 8.00, N 14.54.

**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(*m*-xylylene)cyclomaltoheptaose (47).** Compound **47** was obtained from **46** (83 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 65 mg (quant).  $[\alpha]_D = +7.3$  (c 1.0,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

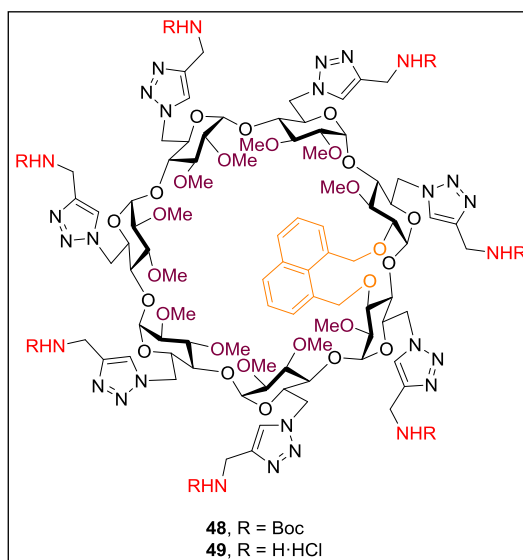
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, 10:1 MeOD: $\text{D}_2\text{O}$ , 323 K):  $\delta$  8.24-8.09 (7 s, 7 H,  $\text{CH}$ -triazole), 7.92 (s, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-2}}$ ), 7.33, (t, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz,  $\text{Ph}_{\text{H-5}}$ ), 7.29 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-4}}$ ), 6.99 (bd, 1 H,  $\text{Ph}_{\text{H-6}}$ ), 5.54-5.39 (5 d, 5 H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz  $\text{H}-1^{\text{III-VII}}$ ), 5.28 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 4.2$  Hz,  $\text{H}-1^{\text{II}}$ ), 5.20, 4.28 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.6$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}2^{\text{I}}$ ), 4.89-3.64 (m, 18 H,  $\text{H}-5^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{H}-6^{\text{I,III-VII}}$ ), 4.66, 4.50 (bd, 2 H,  $J_{6a,6b} = 13.6$  Hz,  $\text{H}-6^{\text{II}}$ ), 4.48, 4.51 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 11.1$  Hz,  $\text{PhCH}_2\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 4.35 (m, 1 H,  $\text{H}-3^{\text{II}}$ ), 4.20-2.86 (m, 18 H,  $\text{H}-2^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{H}-3^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{H}-4^{\text{I,III-VII}}$ ), 4.16 (m, 1 H,  $\text{H}-5^{\text{II}}$ ), 4.12-3.66 (m, 14 H, Triazole- $\text{CH}_2$ ), 4.03 (m, 1 H,  $\text{H}-2^{\text{II}}$ ), 3.96 (m, 1 H,  $\text{H}-1^{\text{I}}$ ), 3.74-3.47 (12 s, 36 H,

OMe), 3.29-3.07 (m, 28 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 3.00-2.81 (m, 28 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 1.35 (m, 1 H,  $\text{H-4}^{\text{II}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz, 10:1 MeOD:D<sub>2</sub>O, 323 K):  $\delta$  140.4, 137.1 ( $\text{Ph}_{\text{C-1,3}}$ ), 141.7 (Triazole-C4), 129.5 ( $\text{Ph}_{\text{C-2}}$ ), 129.4-127.2 ( $\text{Ph}_{\text{C-4-6}}$ , Triazole-C5), 99.6 ( $\text{C-1}^{\text{I}}$ ), 99.4-97.9 ( $\text{C-1}^{\text{II-VII}}$ ), 82.6-77.2 ( $\text{C-2}^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{I,III-VII}}$ ,  $\text{C-4}^{\text{I,III-VII}}$ ), 79.6 ( $\text{C-4}^{\text{II}}$ ), 76.6 ( $\text{C-2}^{\text{II}}$ ), 74.7 ( $\text{PhCH}_2\text{-O3}^{\text{II}}$ ,  $\text{C-3}^{\text{II}}$ ), 72.6 ( $\text{PhCH}_2\text{-O2}^{\text{I}}$ ), 71.2-69.1 ( $\text{C-5}^{\text{I-VII}}$ ), 60.8-57.5 (OMe), 51.6-50.3 ( $\text{C-6}^{\text{I-VII}}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 46.4 (Triazole- $\text{CH}_2$ ), 36.9 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ).

ESI-MS:  $m/z$  2569.1 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 1285.0 [ $\text{M} + 2 \text{H}$ ]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{111}\text{H}_{219}\text{N}_{42}\text{O}_{28}\text{Cl}_{21}$ : C 39.98, H 6.62, N 17.64. Found: C 39.63, H 6.29, N 17.31.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(1,8-dimethylnaphthylene)cyclomaltoheptaose (48).** To a solution of **38** (102 mg, 63  $\mu\text{mol}$ ) in acetone (13 mL) was added **77** (122 mg, 0.79 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (150  $\mu\text{L}$ , 0.88 mmol, 2.0 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (2 mg, 4  $\mu\text{mol}$ , 10 meq.) and the

mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (15 mL) and washed with water (10 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 142 mg (84%).  $R_f$  0.39 (15:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +28.6$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.98 (bs, 1 H, Naphth<sub>H-5</sub>), 7.96 (bs, 1 H, Naphth<sub>H-4</sub>), 7.75-7.61 (7s, 7 H, CH-triazole), 7.59 (dd, 2 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$  Hz, Naphth<sub>H-2,7</sub>), 7.52, 7.50 (2 t, 2 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz, Naphth<sub>H-3,6</sub>), 6.92 (bs, 7 H, NHBoc), 6.27, 4.67 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.9$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.61, 4.62 (2 d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.4$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.52 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.51-5.47 (m, 6 H, H-1<sup>II-VII</sup>), 4.76 (m, 2 H, H-6<sup>II</sup>), 4.67-4.34 (m, 12 H, H-6<sup>I,III-VII</sup>), 4.40-4.05 (m, 12 H, H-5<sup>I,III-VII</sup>), 4.31 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.23-4.06 (m, 14 H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 3.92 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.63-3.23 (m, 12 H, H-3<sup>I,III-VII</sup>), 3.61-3.35 (12 s, 36 H, OMe), 3.61 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.33 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.12-2.99 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 3.07 (dd, 1 H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz, H-2<sup>II</sup>), 1.36-1.32 (7 s, 63 H, CMe<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  156.0 (CO), 145.7 (Triazole-C4), 135.7-132.9 (Naphth<sub>C-1,2,7-10</sub>), 131.0 (Naphth<sub>C-4,5</sub>), 127.0 (Naphth<sub>C-3,6</sub>), 125.0 (Triazole-C5), 100.0 (C-1<sup>I</sup>), 98.5-97.7 (C-1<sup>II-VII</sup>), 82.1-78.8 (C-2<sup>I-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 80.9 (C-3<sup>II</sup>), 78.5 (Cq), 71.1 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.1-69.5 (C-5<sup>I-VII</sup>), 69.2 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 61.1, 58.3 (OMe), 50.3-49.9 (C-6<sup>I-VII</sup>), 36.3 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 28.7 (CMe<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  2738.9  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1380.9  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{122}\text{H}_{186}\text{N}_{28}\text{O}_{42}$ : C 53.93, H 6.90, N 14.43. Found: C 54.21, H 7.21, N 14.19.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(1,8-**

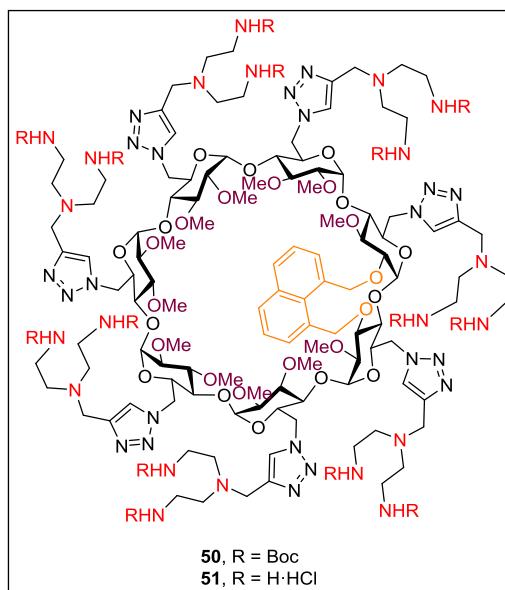
**dimethylnaphthylene)cyclomaltoheptaose (49).** Compound **49** was obtained from **48** (82 mg, 30  $\mu$ mol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 78 mg (quant).  $[\alpha]_D = +40.0$  (*c* 1.0, MeOH).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 323 K):  $\delta$  8.42 (bd, 2 H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.6 Hz, Naphth<sub>H-4,5</sub>), 8.41-7.78 (m, 11 H, *CH*-triazole, Naphth<sub>H-2,3,6,7</sub>), 6.02, 4.51 (d, 1 H, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.63 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.2 Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.55 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.7 Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.61-5.54 (m, 6 H, NaphthCH<sub>2a</sub>-O2<sup>I</sup>, H-1<sup>III-VII</sup>), 4.99-4.33 (m, 25 H, NaphthCH<sub>2b</sub>-O2<sup>I</sup>, H-5<sup>III-VII</sup>, H-6<sup>III-VII</sup>, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.97 (bd, *J*<sub>6a,6b</sub> = 13.1 Hz, 1 H, H-6a<sup>II</sup>), 4.96 (dd, *J*<sub>6a,6b</sub> = 12.5 Hz, 2 H, H-6<sup>I</sup>), 4.79 (m, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 4.60 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.38 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 3.98 (t, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.93-3.37 (m, 12 H, H-3<sup>I,III-VII</sup>, H-4<sup>I,III-VII</sup>), 3.82-3.25 (12 s, 36 H, OMe), 3.69 (t, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.54 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.34 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> = 9.2 Hz, H-2<sup>I</sup>), 3.32-3.21 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  139.6 (Triazole-C4), 135.4-125.7 (Naphth), 127.6-125.7 (Triazole-C5), 100.1-97.8 (C-1<sup>I-VII</sup>), 83.6 (C-2<sup>I</sup>), 81.1-78.6 (C-2<sup>III-VII</sup>, C-3<sup>I-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 78.0 (C-2<sup>II</sup>), 76.9 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.2 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 70.5-69.2 (C-5<sup>I-VII</sup>), 61.0-58.0 (OMe), 50.5 (C-6<sup>I-VII</sup>), 33.9 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

ESI-MS: *m/z* 2038.8 [M + Na]<sup>+</sup>, 1040.2 [M + H + Cu]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>87</sub>H<sub>137</sub>N<sub>28</sub>O<sub>28</sub>: C 46.01, H 6.08, N 17.27. Found: C 45.87, H 5.78, N 16.95.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(1,8-dimethylnaphthylene)cyclomaltoheptaose (50).** To a solution of **38** (82 mg, 50  $\mu$ mol) in acetone (10 mL) was added **78** (216 mg, 0.63 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (90  $\mu$ L, 0.53 mmol, 1.5 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (1 mg, 4  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (10 mL) and washed with water (8 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 113 mg (56%).  $R_f$  0.27 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D^{25} = +20.0$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.96 (bd, 2 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$  Hz,  $\text{Naphth}_{\text{H-4,5}}$ ), 7.84, (m, 7 H,  $\text{CH-triazole}$ ), 7.60 (m, 2 H,  $\text{Naphth}_{\text{H-2,7}}$ ), 7.52, 7.48 (2 d, 2 H,  $\text{Naphth}_{\text{H-3,6}}$ ), 6.22 (m, 8 H,  $\text{NHBoc}$ ,  $\text{NaphthCH}_{2a}\text{-O}3^{\text{II}}$ ), 5.61, 4.60 (2 d, 2 H,

$^2J_{\text{H,H}} = 9.3$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.49 (bs, 1 H, H-1<sup>I</sup>), 5.43 (m, 6 H, H-1<sup>II-VII</sup>), 4.80-4.55 (m, 15 H, H-6<sup>I-VII</sup>, NaphthCH<sub>2b</sub>-O3<sup>II</sup>), 4.36 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.33-4.16 (m, 6 H, H-5<sup>I,III-VII</sup>), 3.89 (m, 1 H, H-3<sup>II</sup>), 3.76-2.96 (m, 48 H, H-3<sup>I,III-VII</sup>, H-4<sup>I,III-VII</sup>, OMe), 3.70 (m, 14 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.61 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.58 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.11-2.95 (m, 33 H, CH<sub>2</sub>NHBoc, H-2<sup>III-VII</sup>), 3.06 (m, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 2.50 (m, 28 H CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 1.37-1.34 (m, 108 H, CMe<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 343 K):  $\delta$  156.0 (CO), 143.3 (Triazole-C4), 135.7-120.4 (Naphth<sub>C-1,2,7-10</sub>), 131.0 (Naphth<sub>C-4,5</sub>), 126.5-125.4 (Triazole-C5, Naphth<sub>C-3,6</sub>), 100.2 (C-1<sup>I</sup>), 98.6-98.0 (C-1<sup>II-VII</sup>), 81.4-75.6 (C-2<sup>I-VII</sup>, C-3<sup>I-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 78.1 (Cq), 70.1-68.9 (C-5<sup>I-VII</sup>, NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 63.5-58.5 (OMe), 53.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 50.5 (C-6<sup>I-VII</sup>), 48.5 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 28.7 (CMe<sub>3</sub>).

ESI-MS:  $m/z$  4019.1 [M + H]<sup>+</sup>, 2011.3 [M + 2 H]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>185</sub>H<sub>312</sub>N<sub>42</sub>O<sub>56</sub>: C 55.26, H 7.82, N 14.63. Found: C 55.48, H 7.98, N 14.36.

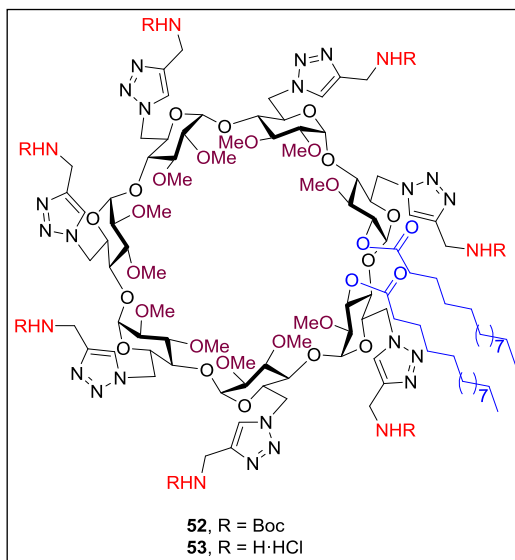
**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-(1,8-dimethylnaphthylene)cyclomaltoheptaose (51).** Compound **51** was obtained from **50** (73 mg, 18  $\mu\text{mol}$ ) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 60 mg (quant).  $[\alpha]_{\text{D}} = +3.2$  (*c* 0.5, H<sub>2</sub>O).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, 10:1 MeOD:D<sub>2</sub>O, 323 K):  $\delta$  8.29-8.27 (m, 7 H, CH-triazole), 7.94 (dd, 2 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-4,5</sub>), 7.66 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, Naphth<sub>H-7</sub>), 7.62 (dd, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$  Hz, Naphth<sub>H-2</sub>), 7.50 (t, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$  Hz, Naphth<sub>H-6</sub>), 7.48 (t, 1 H,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$  Hz, Naphth<sub>H-3</sub>), 6.32, 4.73 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 8.9$  Hz, NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 5.67, 4.70 (2d, 2 H,  $^2J_{\text{H,H}} = 9.7$  Hz, NaphthCH<sub>2a</sub>-O2<sup>I</sup>), 5.57 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.8$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.56-5.51 (m, 5 H, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.54 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 4.94-4.78 (m, 14 H, H-6<sup>I,III-VII</sup>),

4.88 (m, 2 H, H-6<sup>II</sup>), 4.57-4.35 (m, 6 H, H-5<sup>I,III-VII</sup>), 4.41 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 4.12-4.03 (m, 14 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 4.05-3.22 (m, 12 H, H-3<sup>I,III-VII</sup>, H-4<sup>I,III-VII</sup>), 3.76 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 3.67 m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 3.49 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.21 (dd, 1 H, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.17-3.12 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 3.74-3.50 (12 s, 36 H, OMe), 3.05-2.99 (m, 14 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, 10:1 MeOD:D<sub>2</sub>O):  $\delta$  140.6 (Triazole-C4), 135.7-132.6 (Naphth<sub>C-1,2,7-10</sub>), 130.7 (Naphth<sub>C-4,5</sub>), 128.1 (Triazole-C5), 124.9 (Naphth<sub>C-3,6</sub>), 100.2 (C-1<sup>I</sup>), 98.3-97.9 (C-1<sup>II-VII</sup>), 81.9-78.7 (C-2<sup>I-VII</sup>, C-3<sup>I-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 77.1 (NaphthCH<sub>2</sub>-O3<sup>II</sup>), 71.4 (NaphthCH<sub>2</sub>-O2<sup>I</sup>), 70.3-69.1 (C-5<sup>I-VII</sup>), 60.9-57.8 (OMe), 50.7-50.2 (C-6<sup>I-VII</sup>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 46.5 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 33.4 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

Anal. Calcd. for C<sub>115</sub>H<sub>214</sub>N<sub>42</sub>O<sub>28</sub>Cl<sub>14</sub>: C 44.14, H 6.89, N 18.80. Found: C 43.79, H 6.50, N 18.44.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis[4-(*tert*-butoxycarbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-myristoylcyclomaltoheptaose (52).** To a solution of **39** (100 mg, 53  $\mu$ mol) in

acetone (12 mL) was added **77** (103 mg, 0.66 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (95  $\mu$ L, 0.55 mmol, 1.5 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (1 mg, 4  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum pressure and the residue taken into DCM (10 mL) and washed with water (8 mL). The organic layer was dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtered and the solvent removed under vacuum. The residue was purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 120 mg (76%).  $R_f$  0.37 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +56.6$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  7.73-7.66 (m, 7 H, *CH*-triazole), 6.89 (bs, 7 H, *NHBoc*), 5.44 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.3$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.42-5.39 (m, 5 H, H-1<sup>III-VII</sup>), 5.37 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.2$  Hz, H-1<sup>I</sup>), 5.31 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.6$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 4.61-4.38 (m, 10 H, H-6<sup>III-VII</sup>), 4.57 (dd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.7$  Hz, H-2<sup>I</sup>), 4.44 (m, 2 H, H-6<sup>II</sup>), 4.44 (m, 2 H, H-6<sup>I</sup>), 4.24-3.98 (m, 5 H, H-5<sup>III-VII</sup>), 4.21 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 4.13-3.99 (m, 14 H,  $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 4.12 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.55-3.27 (m, 10 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.54-3.33 (12 s, 36 H, *OMe*), 3.52 (t, 1 H,  $J_{3,4} = 8.5$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.46 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 8.5$  Hz, H-4<sup>I</sup>), 3.33 (m, 1 H, H-4<sup>II</sup>), 3.13-3.02 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 3.11 (bd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.11 (s, 63 H, *CMe*<sub>3</sub>), 2.37-2.24 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ -2), 1.66-1.55 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ -3), 1.41-1.22 (m, 20 H,  $\text{CH}_2$ -4 -  $\text{CH}_2$ -13), 0.89-0.85 (m, 6 H,  $\text{CH}_3$ -14).

$^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 343 K):  $\delta$  172.8-172.2 (CO ester), 156.1 (CO carbamate), 145.8 (Triazole-C4), 125.1 (Triazole-C5), 100.9-96.3 (C-1<sup>I-VII</sup>), 82.2-78.2 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 73.3-69.8 (C-5<sup>I-VII</sup>), 72.4 (C-2<sup>I</sup>), 71.3 (C-3<sup>II</sup>), 63.5 (*Cq*), 61.2-58.2 (*OMe*), 51.5-49.4 (C-6<sup>I-VII</sup>), 36.2 ( $\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 34.5-32.9 ( $\text{CH}_2$ -2), 31.0-28.6, 22.4, 16.3 ( $\text{CH}_2$ -4 -  $\text{CH}_2$ -13), 29.4-28.6 (*CMe*<sub>3</sub>), 25.0-24.7 ( $\text{CH}_2$ -3), 14.2 ( $\text{CH}_3$ -14).

ESI-MS:  $m/z$  3008.0  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ; 1516.4  $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$ .

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{138}\text{H}_{230}\text{N}_{28}\text{O}_{44}$ : C 55.52, H 7.77, N 13.14. Found: C 55.37, H 7.90, N 12.72.

**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis-[(4-aminomethyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)]-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-myristoylcyclomaltoheptaose (53).**

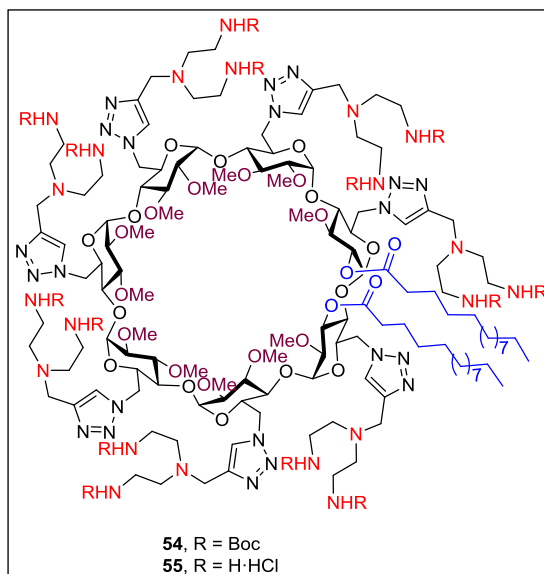
Compound **53** was obtained from **52** (45 mg, 15  $\mu$ mol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 43 mg (quant).  $[\alpha]_D = + 29.9$  (c 1.0, H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, 10:1 MeOD-D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.25-8.20 (m, 7 H, *CH*-triazole), 5.55 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.0$  Hz, H-1<sup>II</sup>), 5.50-5.45 (m, 6 H, H-1<sup>I,III-VII</sup>), 5.48 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$  Hz, H-3<sup>II</sup>), 4.87 (m, 1 H, H-6a<sup>II</sup>), 4.67 (m, 1 H, H-6b<sup>II</sup>), 4.64 (bd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz, H-2<sup>I</sup>), 4.42 (m, 1 H, H-5<sup>I</sup>), 4.29 (m, 1 H, H-5<sup>II</sup>), 3.67 (m, 1 H, H-4<sup>I</sup>), 3.52 (t, 1 H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4<sup>II</sup>), 3.27 (dd, 1 H, H-2<sup>II</sup>), 3.51 (m, 1 H, H-3<sup>I</sup>), 4.92-4.47 (m, 12 H, H-6<sup>I,III-VII</sup>), 4.39-4.13 (m, 12 H, H-5<sup>III-VII</sup>, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.71-3.32 (m, 10 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>III-VII</sup>), 3.67-3.44 (12 s, 36 H, OMe), 3.21-3.14 (m, 5 H, H-2<sup>III-VII</sup>), 2.51-2.31 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-2), 1.75-1.59 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-3), 1.44-1.19 (m, 40 H, CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 0.94-0.88 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>-14).

<sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, 10:1 MeOD-D<sub>2</sub>O):  $\delta$  173.6, 172.6 (CO), 139.6 (Triazole-C4), 127.4 (Triazole-C5), 99.0-98.4, 96.5 (C-1<sup>I-VII</sup>), 81.6-78.2 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 72.1 (C-2<sup>I</sup>), 71.5 (C-3<sup>II</sup>), 71.0-69.5 (C-5<sup>I-VII</sup>), 61.4-60.7, 58.6-57.8 (OMe), 50.5 (C-6<sup>I-VII</sup>), 34.4-33.8 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-2), 31.9, 29.8-28.9, 22.6 (CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 25.0-24.8 (CH<sub>2</sub>-3), 13.8 (CH<sub>3</sub>-14).

ESI-MS:  $m/z$  1164.9 [M + 2 Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>103</sub>H<sub>181</sub>N<sub>28</sub>O<sub>30</sub> Cl<sub>7</sub>: C 48.71, H 7.18, N 15.44. Found: C 48.35, H 6.90, N 15.09.



**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-*O*-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-*O*-**

**myristoylcyclomaltoheptaose (54).** To a solution of **39** (91 mg, 48  $\mu$ mol) in acetone (10 mL) was added **78** (0.21 g, 0.60 mmol, 1.8 eq.), DIPEA (86  $\mu$ L, 0.50 mmol, 1.5 eq.), and  $\text{CuI} \cdot (\text{EtO})_3\text{P}$  (2 mg, 3  $\mu$ mol, 10 meq.) and the mixture was stirred under reflux for 16 h. Then, the solvent was removed under vacuum, the residue was taken in DCM (15 mL) and the solution was then washed with  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL). The organic layer was dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrated and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting residue purified by column chromatography (50:1  $\rightarrow$  15:1 DCM-MeOH). Yield 174 mg (85%).  $R_f$  0.37 (20:1 DCM-MeOH).  $[\alpha]_D = +11.5$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 323 K):  $\delta$  7.87-7.80 (m, 7 H, *CH*-triazole), 6.44-6.24 (bs, 14 H, *NHBoc*), 5.45-5.36 (m, 7 H,  $\text{H}-1^{\text{I-VII}}$ ), 5.32 (t, 1 H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.5$  Hz,  $\text{H}-3^{\text{II}}$ ), 4.77-4.55 (m, 14 H,  $\text{H}-6^{\text{I-VII}}$ ), 4.51 (bd, 1 H,  $J_{2,3} = 9.5$  Hz,  $\text{H}-2^{\text{I}}$ ),

4.33-4.12 (m, 7 H, H-5<sup>I-VII</sup>), 3.75-3.58 (m, 14 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.56-3.13 (m, 48 H, H-3<sup>III-VII</sup>, H-4<sup>I-VII</sup>, OMe), 3.51 (t, 1 H,  $J_{3,4} = 9.5$  Hz, H-3<sup>I</sup>), 3.08-2.92 (m, 6 H, H-2<sup>II-VII</sup>), 3.03-2.92 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.49-2.40 (m, 32 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc, CH<sub>2</sub>-2), 1.63-1.51 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-3), 1.38-1.33 (m, 166 H, CMe<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 0.89-0.72 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>-14).

<sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.2, 172.5 (CO ester), 156.0 (CO carbamate), 143.8-143.2 (Triazole-C4), 127.0-126.0 (Triazole-C5), 98.6-96.4 (C-1<sup>I-VII</sup>), 82.01-77.6 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 77.9 (Cq), 72.4 (C-2<sup>I</sup>), 71.1 (C-3<sup>II</sup>), 70.6-69.2 (C-5<sup>I-VII</sup>), 61.3-61.0, 58.6-58.3 (OMe), 53.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 50.6-47.6 (C-6<sup>I-VII</sup>, Triazole-CH<sub>2</sub>), 38.6 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 34.4-33.7 (CH<sub>2</sub>-2), 31.8-22.6 (CH<sub>2</sub>-3 - CH<sub>2</sub>-13), 30.3-22.7 (CMe<sub>3</sub>), 14.4 (CH<sub>3</sub>-14).

ESI-MS: *m/z* 4311.0 [M + Na]<sup>+</sup>, 2156.4 [M + H + Na]<sup>2+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>201</sub>H<sub>356</sub>N<sub>42</sub>O<sub>58</sub>: C 56.28, H 8.37, N 13.72. Found: C 56.35, H 8.50, N 13.46.

**6<sup>I-VII</sup>-Heptakis{4-[*N,N*-bis(2-aminoethyl)aminomethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl}-6<sup>I-VII</sup>-heptadeoxy-2<sup>II-VII</sup>,3<sup>I,III-VII</sup>-dodeca-O-methyl-2<sup>I</sup>,3<sup>II</sup>-O-myristoylcyclomaltoheptaose (55).** Compound **55** was obtained from **54** (55 mg, 13 μmol) using the procedure described in General Methods (Boc cleavage). Yield 52 mg (quant). [α]<sub>D</sub> = + 10.4 (c 1.0, H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, 10:1 MeOD:D<sub>2</sub>O): δ 8.52-8.21 (m, 7 H, CH-triazole), 5.63-5.43 (m, 7 H, H-1<sup>I-VII</sup>), 5.49 (m, 1 H, H-3<sup>II</sup>), 4.71-4.31 (m, 7 H, H-5<sup>I-VII</sup>), 4.41 (m, 1 H, H-2<sup>I</sup>), 4.00-3.79 (m, 14 H, Triazole-CH<sub>2</sub>), 3.76-3.19 (m, 13 H, H-3<sup>I,III-VII</sup>, H-4<sup>I-VII</sup>), 3.69-3.31 (12 s, 36 H, OMe), 3.56-3.18 (m, 14 H, H-6<sup>I-VII</sup>), 3.30-3.08 (m, 6 H, H-2<sup>II-VII</sup>), 3.18 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.83 (m, 28 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.52-2.35 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-2), 1.76-1.63 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-3), 1.60-1.23 (m, 40 H, CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 0.94-0.89 (m, 6 H, CH<sub>3</sub>-14).



$^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz, 10:1 MeOD:D<sub>2</sub>O):  $\delta$  174.5-173.5 (CO), 141.6 (Triazole-C4), 130.0-127.7 (Triazole-C5), 99.1-97.8 (C-1<sup>I-VII</sup>), 81.9-78.5 (C-2<sup>II-VII</sup>, C-3<sup>I,III-VII</sup>, C-4<sup>I-VII</sup>), 71.3 (C-3<sup>II</sup>), 70.3-69.3 (C-5<sup>I-VII</sup>), 70.2 (C-2<sup>I</sup>), 61.1-57.6 (OMe), 53.7-52.8 (C-6<sup>I-VII</sup>), 50.9-49.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 46.0 (Triazole-CH<sub>2</sub>), 38.7-22.3 (CH<sub>2</sub>-4 - CH<sub>2</sub>-13), 36.8 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 34.4-33.5 (CH<sub>2</sub>-2), 22.7 (CH<sub>2</sub>-3), 13.2 (CH<sub>3</sub>-14).

ESI-MS:  $m/z$  1050.4 [M + TFA + 2 Cu + Na]<sup>3+</sup>, 1017.4 [M + CuCl + Cu + 2 H]<sup>3+</sup>.

Anal. Calcd. for C<sub>131</sub>H<sub>258</sub>Cl<sub>14</sub>N<sub>42</sub>O<sub>30</sub>: C 46.30, H 7.65, N 17.31.

Found: C 43.14, H 7.331, N 15.88.

- 
- <sup>1</sup> Sybyl-X 2.0 Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- <sup>2</sup> M. Clark, R. D. Cramer III, N. Van Opdenbosch, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- <sup>3</sup> M. J. Frisch *et al.*, Gaussian 03, Revision C.02, ed.; Gaussian, Inc, Wallingford CT, 2004.
- <sup>4</sup> a) A. P. Bisson, F. J. Carver, D. S. Eggleston, R. C. Haltiwanger, C. A. Hunter, D. L. Livingstone, J. F. McCabe, C. Rotger, A. E. Rowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8856-8868; b) A. P. Bisson, C. A. Hunter, J. C. Morales, K. Young, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 845-851.
- <sup>5</sup> a) <http://supramolecular.org/>; b) D. B. Hibbert, P. Thordarson, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 12792-12805; c) P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.
- <sup>6</sup> a) M. Skiba, D. Wouessidjewe, F. Puisieux, D. Duchêne, A. Gulik, *Int. J. Pharm.* **1996**, *142*, 121-124; b) H. C. Fessi, J.-P. Devissaguet, F. Puisieux, C. U. S. Thies, USA Patent 5, 118, 528, June 2, **1992**.
- <sup>7</sup> Y. Xu, S. W. Hui, P. Frederik, F. C. Szoka, Jr. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 341-353.
- <sup>8</sup> a) A. Díaz-Moscoso, L. Le Gourriérec, M. Gómez-García, J. M. Benito, P. Balbuena, F. Ortega-Caballero, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12871-12888; b) V. Bagnacani, F. Sansone, G. Donofrio, L. Baldini, A. Casnati, R. Ungaro, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3953-3956.
- <sup>9</sup> J. Sjeztli, A. Lipták, I. Jodál, P. Fügedi, P. Nánasi, A. Neszmélkyi, *Starch*, **1980**, *32*, 165-169.
- <sup>10</sup> a) B. Roizel, J. P. Baltaze, P. Sinaÿ, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2371-2373; b) S. Xiao, M. Yang, P. Sinaÿ, Y. Blériot, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1510-1516.
- <sup>11</sup> X. Luo, Y. Chen, J. G. Huber, Y. Zhang, P. Sinaÿ, *C. R. Chim.* **2004**, *7*, 25-28.
- <sup>12</sup> W. Kemp, I. T. Storie, C. D. Tulloch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2812-2817.
- <sup>13</sup> K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **1989**, *2*, 203-221.
- <sup>14</sup> K. Takeo, K. Uemura, H. Mitoh, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 293-308.
- <sup>15</sup> J. Boger, R. J. Corcoran, J.-M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 2190-2218.
- <sup>16</sup> A. Méndez-Ardoy, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, F. Santoyo-González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5882-5894.
- <sup>17</sup> P. R. Ashton, R. Königer, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 903-908.
- <sup>18</sup> A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2681-2684.

- 
- <sup>19</sup> L. Gallego-Yerga, J. M. Benito, L. Blanco-Fernández, M. Martínez-Negro, I. Vélaz, E. Aicart, E. Junquera, C. Ortiz Mellet, C. Tros de Ilarduya, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 3825-3835.